

Aus dem Mikrobiologischen Institut
der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt am Main
(Direktor: Professor Dr. phil. R. W. Kaplan)

**Studien über die Verwendung
von Bakterien zur Prüfung
von Chemikalien auf Mutationsauslösung**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

Mgr. ALOIS TUMULKA

Frankfurt am Main

Mai 1964

Aus dem Mikrobiologischen Institut
der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt am Main
(Direktor: Professor Dr. phil. R. W. Kaplan)

**Studien über die Verwendung
von Bakterien zur Prüfung
von Chemikalien auf Mutationsauslösung**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

Mgr. ALOIS TUMULKA
Frankfurt am Main

Mai 1964

Gedruckt mit Genehmigung der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Frankfurt am Main



Der Dekan der Naturw. Fakultät: Prof. Dr. W. Franz

Berichterstatter: Prof. Dr. R. W. Kaplan

Priv. Doz. Dr. H. Prell

Termin der mündlichen Prüfung: 22. u. 23. Juli 1964

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
<u>I. Einleitung</u>	1
<u>II. Experimenteller Teil</u>	4
1. Medien, Wachstoffsstoffe, Lösungen	4
2. Testchemikalien	6
3. Auswahl der Bakterienstämme	8
3.1. Die auxotrophen Mutanten von <i>Serratia marcescens</i> CV	8
3.2. Die Auswahl geeigneter Stämme im Mutabilitätstest	9
3.3. Der Auxotrophiegrad der ausgewählten Stämme	14
3.4. Die spontane Mutabilität der Teststämme	17
4. Der modifizierte Blättchentest	17
4.1. Versuchstechnik der Blättchenmethode	17
4.2. Fehlerstatistische Auswertung des Blättchentests	19
2.1. Auswertung von Testplatten ohne Hemmhof	19
1.1. Der χ -Test	19
1.2. Homogenitätsprüfung	20
1.3. Der t-Test	24
1.4. Die Streuungszzerlegung	25
1.5. Auswahl eines geeigneten Signifikanztestes	25
2.2. Auswertung von Hemmhofplatten	27
2.1. Auswertung des nicht gehemmten Plattentests	28
2.2. Auswertung der Diffusionszonen auf Hemmhofplatten	29
4.3. Ergebnisse der Blättchentestversuche	35
3.1. Signifikanzprüfung im Blättchentest	41
3.2. Elektive Mutagenität	41
3.3. Mutagene Chemikalkonzentration	42
3.4. Koloniezahlverminderung auf Testplatten	42
3.5. Versuche mit unlöslichen Substanzen	44
5. Gradientenplatte und Konzentrationsserientest	45
5.1. Die Gradientenplatte	45
5.2. Der Konzentrationsserientest	46
5.3. Anwendung der Gradientenplatte und des Konzentrationsserientests	46
5.4. Das Auftreten unterschiedlicher Kolonietypen	51

	<u>Seite</u>
6. Die Papillenmethode	54
6.1. Die Bestimmung der Mutationsrate nach der Papillenmethode	54
6.2. Die günstige Wuchsstoffmenge für die Mutationsratenbestimmung	55
6.3. Bestimmung der Zellzahl in papillenfreien Kolonien	57
6.4. Die statistische Auswertung von Papillenversuchen	62
4.1. Der χ -Test	62
4.2. Homogenitätsprüfung der Papillenverteilung	63
4.3. Der t-Test	66
6.5. Ergebnisse der Papillenversuche	67
5.1. Übersicht der Ergebnisse	67
5.2. Vergleich mit den Ergebnissen des Blättchentests	71
5.3. Bewertung zu kleiner Plattenreihen	73
5.4. Unterdrückung von Papillen in der Elterkolonie	76
<u>III. Theoretischer Teil</u>	78
1. Der Prüfstoff im Mutagenitätstest	78
1.1. Die Reinheit des einwirkenden Chemikals	78
1.2. Die Wirkung des Prüfstoffes in der Zelle	79
1.3. Die Wirkungsmechanismen von Mutagenen	80
1.4. Photodynamische Wirkung von Prüfstoffen	82
2. Das Bakterium im Mutagenitätstest	84
3. Methoden der Mutagenitätsprüfung	86
3.1. Versuchstechnische Methoden	86
3.2. Statistische Methoden	88
3.3. Ergebnisse der Mutagenitätsprüfungen	90
4. Elektivität in den Versuchsergebnissen	91
<u>IV. Zusammenfassung</u>	93
<u>V. Literaturverzeichnis</u>	97

I. Einleitung

Chemische Mutagene verursachen nach heutiger Einsicht eine Mutation durch Basenänderung in der aus Desoxyribonukleinsäure (DNS), bei manchen Viren aus Ribonukleinsäure (RNS) (z.B. Gierer und Schramm 1956), bestehenden Erbstruktur. Das mutationsauslösende Chemikal wirkt entweder direkt auf die Erbstruktur, oder aber indirekt über Zwischenprodukte, die in der Zelle entstehen. Eine veränderte, anormale Basensequenz hat die Entstehung eines Lebewesens mit erblichen, meist schädlichen Merkmalsänderungen zur Folge. Dies gilt auch für die Erbstruktur des Menschen, die grundsätzlich den gleichen Bau besitzt wie die der übrigen Lebewesen.

Auf die Gefahren der Erbschädigung durch Chemikalien für den Menschen wurde mehrfach hingewiesen (z.B. R.W. Kaplan 1962; Barthelmeß und Lück 1958). Die Aufnahme von mutagenen Chemikalien in den Körper erfolgt mit Lebensmitteln, Genußmitteln, Heilmitteln, Kosmetika u.ä., die dann über die Blutbahn bis in die Keimzellen vordringen und dort ihre mutationsauslösende Wirkung ausüben können. Die Gefahr der Erbschädigung können wir vermeiden, indem wir die Einwirkung von Mutagenen auf den Menschen ausschalten. Dazu ist es nötig, die vom Menschen aufgenommenen Stoffe auf ihre mutationsauslösende Wirkung zu prüfen.

Gut geeignet für die Prüfung von Chemikalien auf Mutagenität sind Mikroben wegen ihrer raschen Vermehrung und Haploidie, die Mutationen ohne Kreuzung schnell erkennen läßt. An Bakterien können verschiedene, auch selten auftretende Mutationen durch einfache Versuchstechnik festgestellt und fehlerstatistisch ausgewertet werden.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, eine Methodik zur routinemäßigen Überprüfung von Chemikalien auf Mutagenität an Bakterien zu entwickeln sowie die damit verbundenen Probleme zu studieren. Bezüglich des auszuarbeitenden Mutagenitätstests sind folgende Gesichtspunkte wichtig:

1.) In einer mutagenbehandelten Bakterienkultur ist die Erhöhung des Mutantengehaltes noch kein sicheres Anzeichen für Mutationsauslösung; sie könnte durch bevorzugtes Überleben spontaner Mutanten gegenüber den Nichtmutierten bei Abtötung entstanden sein. Eine Selektion kann auch dadurch eintreten, dass Mutanten stärker im Wuchs gehemmt oder abgetötet werden, als die Elterzzellen, wodurch tatsächliche Mutationsauslösung verdeckt wird. Vorteilhafter ist daher die Anwendung solcher Methoden, die nicht den Mutantengehalt, sondern Mutationseignisse zu zählen gestatten. Als solche sind bekannt die Nullkulturmethode (Luria und Delbrück 1943) sowie die Papillenmethode (Ryan et al. 1955). Diese ist einfach auszuführen und eignet sich daher für einen Routinetest besser als jene.

2.) Die bei Mutationsversuchen oft beobachtete Elektivität (z.B. Auerbach und Westergaard 1960), also ein bevorzugtes, auswählendes Ansprechen von bestimmten Allélen, Genen oder Zelltypen durch das Chemikal, macht es notwendig, eine Reihe von Genen und auch verschiedene Organismontypen in den Test einzubeziehen. (Kaplan 1962).

3.) Der Mutagenitätstest muß schon geringe Erhöhung der Mutationshäufigkeit anzeigen können, da aus Gründen der Elektivität auch ein im Test schwach mutagenes Chemikal beim Menschen für zumindest manche Gene hohe Mutagenität haben könnte.

4.) Die Methodik soll einfach auszuführen, gut reproduzierbar sein und quantitative Ergebnisse für die Beurteilung der Mutagenität liefern.

Diesen Anforderungen entspricht am besten die Papillenmethode. Sie ist am einfachsten bei biochemischen Rückmutationen anwendbar. Sie beruht darauf, dass auxotrophe Bakterien auf Minimalagar mit suboptimalem Wachstoffsatz zu Kolonien heranwachsen; spontane sowie durch ein dem Medium

zugesetztes Mutagen während des Koloniewuchses induzierte Prototrophiemutanten wachsen dann als Sekundärkolonien (= Papillen) aus der Elterkolonie heraus. Die Anzahl der Papillen, die ja Mutationsereignisse darstellen, erlaubt dann die Mutationsrate pro Zelle und Zellgeneration zu berechnen. Eine Erhöhung der Mutationsrate über den Spontanwert wird als Maß für die Mutagenität der Testsubstanz gewertet.

Eine Vereinfachung dieser Methode ist der Blättchentest nach Iyer und Szybalski (1958). Er gibt jedoch keine Werte für die Berechnung der Mutationsrate, sondern nur die Mutationshäufigkeit pro ausgeplattete und dann gewachsene Zellzahl an. Ein auf die Agarplatte gelegtes Blättchen enthält das geprüfte Chemikal, das über die mit auxotrophen Zellen dicht beimpfte Platte diffundiert und Mutationen auslösen kann.

Im folgenden sollen der Blättchentest sowie die Papillennmethode darauf untersucht werden, inwieweit sie sich für eine routinemäßige Mutagenitätsprüfung eignen. Zunächst wurden Mutagenitätsversuche an Auxotrophen des nichtpathogenen Bakteriums *Serratia* CV durchgeführt; später sind noch andere Bakterienarten in den Test einzubeziehen. Aus einer Reihe von verschiedenen auxotrophen Stämmen wurden mit Hilfe bekannter mutagener Stoffe, die verschiedene Mechanismen repräsentieren, diejenigen herausgewählt, die in Kombination auf möglichst viele oder gar alle Mutagene ansprechen. Als weiteres wurde die Versuchstechnik und die statistische Auswertung des Blättchentests studiert. Für schwach mutagene oder unklare Ergebnisse ist die Anwendung von feineren Methoden, wie der Gradientenplatte oder Agarplatte mit in bestimmter Konzentration zugesetztem Chemikal geprüft. Für die Papillennmethode waren die Bedingungen für eine günstige Papillenausbildung und der Berechnung der Zellzahl in den Kolonien zu ermitteln. Die Berechnung der Mutationsraten und deren statistischen Signifikanz nach Chemikalieneinwirkung war zu studieren. Eine Prüfung auf echte Prototrophiemutation und auf Unterdrückung von Papillen war vorzunehmen.

II. Experimenteller Teil

1.) Medien, Wachsstoffe, Lösungen

Es wurden in den Versuchen folgende Medien verwendet:

Minimal-Agar für *Serratia*:

Salzlösung:

100 ml dest. Wasser
0,05 g CaCl_2
5,0 g Citronensäure
3,0 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
0,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
6,2 g KOH
0,3 g NaCl
23,8 g Glyzerin (D=1,26)
1,0 ml Spurenlösung

Spurenlösung:

200 ml dest. Wasser
12,0 Borsäureanhydrid
80 mg ZnCl_2
30 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
50 mg $\text{NH}_4 \text{MoO}_4$ oder
 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
60 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
100 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Sterilisiert: 15 Minuten bei 1 Atü

100 ml Salzlösung
900 ml dest. Wasser mit
22,0 g Bacto Agar (Difco)

Im Autoklav 15 Minuten bei
1 Atü getrennt sterilisiert,
dann zusammengossen, pH7
eingestellt und in Petrischa-
len je 20 ml ausgegossen.

Komplett-Agar (NB):

1 l dest. Wasser
8 g Nutrient Broth (Difco)
5 g NaCl
15 g Bacto-Agar (Difco)

Sterilisiert: 15 Minuten bei 1 Atü

Weich-Agar: 0,7 % Bacto Agar (Difco) in dest. Wasser
(ohne Zutaten)

Sterilisiert: 15 Minuten bei 1 Atü

Saline (gepuffert, pH7 : 1·1 dest. Wasser

4 g NaCl

7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

3 g KH_2PO_4

Sterilisiert: 15 Minuten bei 1 Atü

Die dem Medium zugesetzten Wuchsstoffe und Testchemikalien wurden in steriler, gepufferter Saline gelöst.

Verwendete Wuchsstoffe:

L - Leucin Merck, Darmstadt

l - Argininhydrochlorid Merck, Darmstadt

Glycin (=Glykokoll) " "

Filterpapier für Blättchen.

Säuregewaschenes Chromatographiepapier, Sorte 2040 a und b der Firma C. Schleicher & Schüll, Dassel.

Rechteckige Blättchen (1 x 3 cm) wurden 2x in destilliertem Wasser gewaschen, im Autoklav sterilisiert (15 Minuten, 1 Atü) und langsam, über mehrere Tage in 60-80°C getrocknet.

Abkürzungen:

DNS = Desoxyribonukleinsäure

RNS = Ribonukleinsäure

NB = Nutrient Broth

BU = 5 - Bromuracil

AP = 2 - Aminopurin

EMS = Äthylmethansulfonat

TEM = Triäthylenmelamin

DES = Diäthylsulfat

HA = Hydroxylaminhydrochlorid

ATU = 4-Amino-2-Thiouracil

F = Formaldehyd

ges.L. = gesättigte Lösung

2.) Testchemikalien

Chemische Mutagene stellen eine große Gruppe von strukturell sehr verschiedenen Stoffen; hierher gehören anorganische Salze, alkylierende Substanzen, Basenanaloga, Narkotica, Farbstoffe, Alkaloide u.v.a. (z.B. Barthelmeß 1956), für die es sicherlich keinen gemeinsamen Wirkungsmechanismus gibt. In den Versuchen wurde eine Reihe bekannter chemischer Mutagene unterschiedlicher Struktur verwendet, um möglichst verschiedene Mutagenesemechanismen zur Wirkung kommen zu lassen. Außerdem sind einige im Institut vorhandene und bisher nicht als mutagen beschriebene Substanzen, später auch das Schlafmittel Contergan, in die Prüfung einbezogen worden. Manche Mutagene sind nicht gut wasserlöslich; solche wurden gemäß Vorschlag von Jyer und Szybalski (1958) in Aceton gelöst, das selbst nicht mutagen sein darf, was jedesmal durch eine Kontrolle geprüft wurde.

T a b e l l e 1

Verzeichnis der Testchemikalien +)

Nr.	Chemikal	Bezugsquelle	Mutagenitäts- nachweis (im Literatur- verzeichnis)
1	Natriumnitrit	Merck, Darmstadt	36, 50
2	Manganchlorid		17
3	Quecksilber-II-chlorid (Sublimat)		16
4	Wasserstoffperoxyd		16, 35
5	Hydroxylaminhydrochlorid (HA)		23, 35
6	Formaldehyd, 35 Gew.% (F)	- " -	2, 16
7	β -Propiolakton	Fluka AG, Buchs SG, Schweiz	13
8	Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt	16
9	Äthylurethan	- " -	45, 54
10	Diäthylsulfat, reinst (DES)	Schuchardt, München	27

+) Herrn Professor Ried, Inst.Org.Chemie, Ffm. und den Farbwerken Hoechst sei für die Überlassung von einer Reihe der Testsubstanzen an dieser Stelle bestens gedankt.

11	Athylmethansulfonat (EMS)	Centre d'études du Bouchet	19, 22, 35
12	Hydrochinon, reinst	Merck, Darmstadt	38
13	Pyrogallol, Krist.		38
14	Pikrinsäure, reinst, Krist.	- " -	16
15	Äthylenimin	Prof. Ried, Inst. Org. Chemie, Ffm.	19
16	5-Bromuracil, C grade(BU)	California, Corp. for Biochem. Res., Los Angeles 63, USA	8, 21, 40
17	2-Aminopurine, B grade(AP)		15, 21
18	Acriflavine, neutral, C grade		16, 58
19	Coffein, rein	Merck, Darmstadt	16, 44
20	8-Azaguanin	Schuchardt, München	44
21	Triäthylenmelamin (TEM)	Farbwerke Hoechst, Frankfurt/M	7, 29, 35, 41
22	N-Lost	- " -	2
23	Bayer E39 solubile = 2,5-bis- methoxy-äthoxy-3-6-bis-äthylenimino-benzochinon-(1,4)	Bayer, Leverkusen (carcinostatisch wirksam)	28
24	Malachit-grün	Merck, Darmstadt	24
25	Natriumdesoxycholat	- " -	58
26	1,2,5,6-Dibenzanthracen	Schuchardt, München	58
27	Acridin, rein		10, 12
28	β- Naphthylamin, reinst		58
29	3 - Methylholanthren	- " -	58
30	Aceton (als nichtmutagen beschrieben)	Merck, Darmstadt	29

Bisher nicht auf Mutagenität geprüft:

31	N-Methylurethan	Schuchardt, München	
32	Fuchsin	Merck, Darmstadt	
33	Alizarin gelb GG = Natriumsalz der β -Nitrobenzol-(1 azo 5)-salicylsäure	- " -	
34	4-Amino-2-thiouracil (ATU)	Schuchardt, München	
35	Thioharnstoff		
36	Contergan, Tabl. (1 Tablette Contergan enthält 25 mg N-Phthalylglutaminsäure-imid = Thalidomid).	Grün ⁿ ethal, Stolberg	

Feste Stoffe unter den Testchemikalien wurden in einer der folgenden Lösungen zubereitet und in dieser sowie in 2 weiteren Verdünnungsstufen (1:10) geprüft:

- a) in Saline (bzw. in Aceton) gesättigte Lösung (ges.L.); weitere Verdünnungen im gleichen Lösungsmittel:
 10^{-1} ges.L., 10^{-2} ges.L..
- b) molare Lösung (m), = mol/l Lösung; Verdünnungen
 10^{-1} m und 10^{-2} m .
- c) 1 %-tige Lösung, = 1 g/100 g Lösung und die Verdünnungen 0,1 % und 0,01 %
- d) 1 Contergantablette in 10 ml Saline gelöst (~ 1:10) und weiter verdünnt auf 1:100 und 1:1000.

Flüssigkeiten wurden unverdünnt (= 10^0) wie auch in Saline verdünnt getestet. Die Verdünnungsstufen waren 10^{-1} (= 10 Vol-%), und 10^{-2} (= 1 Vol-%). Als Flüssigkeiten waren folgende Chemikalien vorhanden: Wasserstoffperoxyd, Formaldehyd, β -Propiolakton, Essigsäure, N-Methylurethan, Diäthylsulfat, Äthylmethansulfonat, Äthylenimin und Aceton.

3.) Auswahl der Bakterienstämme

3.1.) Die auxotrophen Mutanten von Serratia marcescens CV.

Die aus der Institutssammlung stammende Serie von 8 Spontanmutanten des auxotrophienmutablen Stammes Serratia CV (Kaplan 1959; 1961):

1	Serratia marcescens	CV/rc ₃ / a ₈	= prol ⁻
2		CV/a ₄	= cyt ₂ ⁻
3		CV/a ₁₁	= arg ₁ ⁻
4		CV/rc ₃ / a ₁₉	= arg ₃ ⁻
5		CV/a ₁₄	= met ₂ ⁻
6		CV/a ₁₈	= gly ₁ ⁻
7		CV/a ₂₂	= leu ₁ ⁻
8	- " -	CV/R ₅	= ad ⁻

wurde mit Hilfe bekannter Mutagene einer Eignungsauswahl unterworfen. Hierfür wurde der Mutationsschritt von Auxotrophie zur Anauxotrophie (Prototrophie) gewählt, weil diese Mutation für die zu prüfenden Methoden besonders gut geeignet ist. Die Rückmutanten sind ohne zusätzliche Versuchsbedingungen z.B. Stoffzusätze, leicht als besserwüchsige Kolonien zu erkennen.

3.2.) Auswahl geeigneter Stämme im Mutabilitätstest

Bakterienstämme sind sehr unterschiedlich mutabel, mutagenstabile (Demerec 1953) eignen sich natürlich für einen Mutagenitätstest nicht. Der von Jyer und Szybalski beschriebene Blättchentest ist für die Auslese von gut mutablen Stämmen unter den vorhandenen Mutanten brauchbar.

Auf Komplettagar über Nacht gewachsene Kolonien wurden in Saline suspendiert, davon 0,1 ml mit ca 10^7 Zellen in 3 ml 0,7 % Weichagar bei 48°C übertragen und auf Minimalagar mit NB-Zusatz von 5 γ /ml ausgeplattet. Auf die erstarrte Weichagarschicht wurde seitlich ein 1x3 cm großes steriles Filterpapierblättchen aufgelegt und darauf 0,1 ml der Mutagenlösung sowie auf Kontrollplatten das Lösungsmittel allein (Saline) aufgeträufelt. $MnCl_2$, $HgCl_2$, ebenso alle in Aceton gelösten Substanzen bilden um das Blättchen einen Niederschlag, wodurch ein Teil des Chemikals für die Mutationsauslösung ausfällt.

Die Bakteriensuspension wurde im Weichagar bei 48°C nur sehr kurz dieser Temperatur ausgesetzt, um eventuelle Inaktivierung oder Mutationsauslösung durch Hitze (Ahmed 1963) zu vermeiden.

Die Mutageneinwirkung sollte während des Bakterienwachstums erfolgen. Einige Mutagene, z.B. BU, AP, müssen während der Verdoppelung der DNS in diese eingebaut werden. Andererseits ist für die Überführung einer induzierten Prämutation in eine perfekte Mutation DNS-Verdoppelung notwendig. Auch die Phänauspprägung benötigt Stoffwechsel. Die Zugabe von 5 γ NB-Pulver

pro ml Medium reicht aus, um ein Restwachstum auf etwa 10^8 Zellen/Platte zu gestatten und 60-100 Kolonien spontaner Mutanten pro Platte zu liefern. Während der Inkubation bei 30°C über 4-5 Tage diffundiert das Chemikal ins Medium und induziert in den wachsenden Zellen eventuell Prototrophienmutationen, die in den folgenden Tagen zu gut sichtbaren Kolonien heranwachsen.

Eine Mutationsauslösung erfolgt meist in höheren Chemikalienkonzentrationen, die noch Wuchs zulassen (z.B. Demerec und Hanson 1951). Daher ist es nötig, die Substanzen von der Grenze ihrer Löslichkeit oder Giftigkeit für den Testorganismus an stufenweise verdünnt über einen weiten Konzentrationsbereich auf Mutationsauslösung zu prüfen. Zwei Testkonzentrationen im Abstand 1:100 reichten für den obigen Zweck meist aus. Je 2 Platten wurden pro Konzentration hergestellt.

Ausgezählt wurden die Mutantenkolonien

- 1) als Gesamtkoloniezahl pro Platte sowie
- 2) als Koloniezahl in den Diffusionszonen (bestimmter Größe) vom Blättchen ausgehend. (Fig. 1)

Die Zoneneinteilung der Platte geschah durch Auflegen auf eine Scheibe mit 1 cm^2 -Raster. Tabelle 2 demonstriert als Beispiel die Auszählung von Blättchentestplatten mit BU und AP beim Stamm met₂.



Fig. 1 Schema einer Blättchentestplatte.

I - V = getrennt ausgewertete Diffusionszonen ($2 \times 1\text{ cm}$).

Tabelle 2

Blättchentest auf Mutabilität von Ser.marc.met₂ mit den Mutagenen BU und AP. (Vers. 77).

Teststoff	Gesamtkol.- Zahl/Platte	davon in Zonen				
		I	II	III	IV	V
Spontan- Kontrolle	204	7	7	5	8	9
	178	5	5	8	13	9
	154	4	7	5	11	6
	167	6	5	9	7	9
Mittel:	175,75 [±] 6,63					
BU	249	16	10	9	7	3
	ges.Lös. 284	15	9	8	10	9
	Mittel: 266,5 [±] 11,5	15,5	9,5	8,5	8,5	6
	10 ⁻² ges.L. 181	10	10	4	5	4
	171	9	6	7	6	5
Mittel:	176,0 [±] 9,36	9,5	8	5,5	5,5	4,5
AP	182	2	6	6	10	9
	ges.L 191	7	10	6	8	10
	Mittel: 186,5 [±] 0,65	4,5	8	6	9	9,5
	197	2	8	7	10	10
10 ⁻² ges.Lös.	169	4	6	10	4	8
Mittel:	183,0 [±] 9,56	3	7	8,5	7	9

Mittelwert in den Zonen der Spontankontrolle:
 $\bar{X} \pm \sigma_x = 7,25 \pm 0,52$

Mittelwert der Gesamtkoloniezahl der Spontankontrolle:
 $\bar{M} \pm \sigma_M = 175,75 \pm 6,63$

+) Die Berechnung der Fehler ist in dieser Arbeit wie folgt zu unterscheiden:

$$s = \sqrt{\frac{\sum \Delta^2}{n \cdot (n-1)}} = \text{Standardabweichung}$$

$$\sigma = \sqrt{M} = \text{Poissonstreuung}$$

Die Auswertung der Zonenfelder ist wegen der geringen Koloniezahl sehr unsicher. Sie ist nur bei Wuchshemmung und einer erhöhten Koloniezahl in der nächstfolgenden Zone bedeutsam, was dann als Hinweis auf Mutagenität zu werten und in weiteren Versuchen zu überprüfen ist.

Die Ergebnisse des Mutabilitätstest mit 24 Chemikalien an den 8 auxotrophen Stämmen sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Da dieser Test zur nur groben Orientierung über die Brauchbarkeit der Stämme diente, wurde auf eine statistische Analyse verzichtet und nur die prozentuelle Erhöhung der Mutantenkoloniezahl über den Spontanwert vermerkt.

Die einzelnen Stämme sprechen recht unterschiedlich auf die Mutagene an. Die ad^- -Mutante weist eine hohe Mutagenelektivität auf; nur 2 von 22 getesteten Mutagenen lösten bei ihr deutlich Mutationen aus. Pyrogallol induziert von den geprüften Stämmen nur den gly-Stamm zur Reversion, was als Stammelektivität des Mutagens bezeichnet wird (Demerec 1955). Bei den übrigen Stämmen findet man kombiniert sowohl Mutagenelektivität von Stämmen wie auch Stammelektivität von Chemikalien. Die unterschiedlichen Ergebnisse bei arg_1^- und arg_3^- lassen eine Elektivität zwischen zwei Allelen des arg -Gens vermuten (intragenische Elektivität).

Table 3 : Resultate des Mutabilitätstests mit der Blättchen-
methode an 8 Auxotrophienmutanten von
Serratia marcescens CV.

	ad ⁻		prol ⁻		met ⁻		leu ⁻		cyt ⁻		arg ⁻		gly ⁻	
	Pl	Z	Pl	Z	Pl	Z	Pl	Z	Pl	Z	Pl	Z	Pl	Z
1 MnCl ₂	.	.	.	.	I	I	I	.	.	.	.	.	.	.
2 HgCl ₂	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3 Hydroxylamin	.	.	.	.	I	+	.	.	.	.	.	.	.	.
4 Formaldehyd	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5 Essigsäure	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6 β-Propiolaktone	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7 Äthylurethan	.	.	.	.	I	I	.	.	.	.	.	.	.	.
8 Hydrochinon	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
9 Pyrogallol	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
10 Pikrinsäure	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
11 Coffein	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12 5-Bromuracil	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
13 2-Aminopurin	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
14 Malachitgrün	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15 Acridin	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16 Acridin	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
17 Acridin in H ₂ O	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
18 β-Naphtylamin in H ₂ O	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
19 Na-Desoxycholat	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
20 Thioharnstoff	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
21 4-Amino-2-Thiouracil	++	++	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
22 Fuchsin	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
23 Alizarin	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
24 N-Methylurethan	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Anzahl mutagener Chemikalien bei	2	1	4	11	9	13	11	16	5	5	11	12	18	18
den einzelnen Stämmen:														

Zeichenerklärung:

Erhöhung der Koloniezahl über das Spontaniveau:

i = keine oder bis 10 %
+ = bis 50 % (= schwache Mutationsauslösung)

++ = über 50 % (= deutliche Mutationsauslösung)

+++ = über 200 % (= starke Mutationsauslösung)

Pl = Plattenauswertung (Gesamtkoloniezahl pro Platte)

Z = Zonenauswertung (in einzelnen oder mehreren Zonen klar erhöhte Mutantenkoloniezahl).

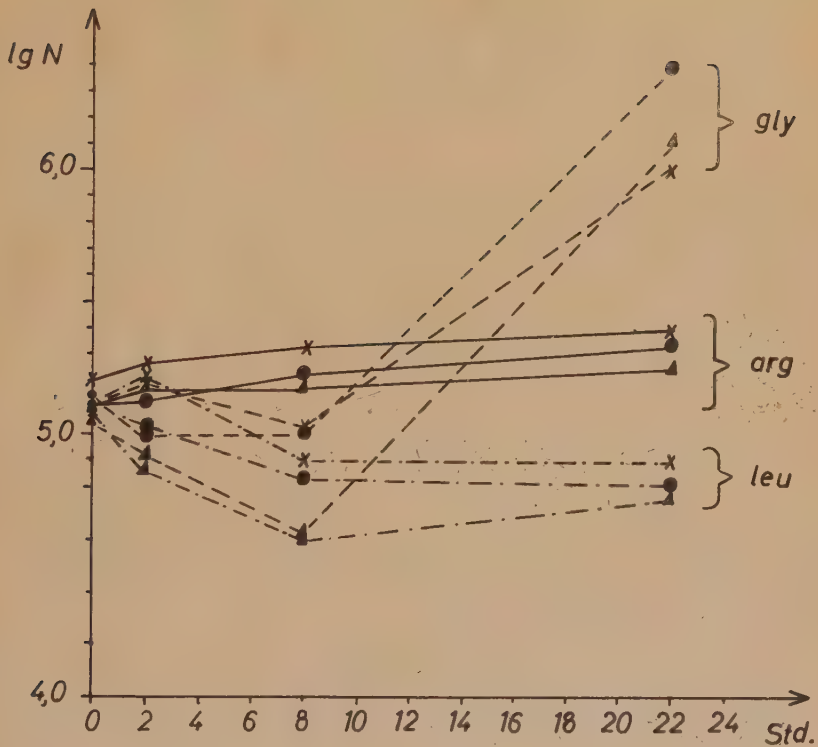
Für die weiteren Versuche wurden einige für viele der Stoffe gut mutable Stämme ausgewählt. Dabei sollten sich die Stämme in der Empfindlichkeit gegenüber den getesteten Mutagenen möglichst ergänzen, damit alle Wirkungsmechanismen erfaßt sind und die Chance des Nichterkennens eines neuen Mutagens infolge seiner neuen Wirkungsart möglichst klein bleibt. Die Stämme gly₁⁻, leu₁⁻ und arg₁⁻ entsprechen dieser Forderung am besten, jedes der schon bekannten oder neu gefundenen Mutagene mutiert wenigstens einen von ihnen.

3.5.) Der Auxotrophiegrad der ausgewählten Stämme

Die pauschale Zugabe von 5 μ g NB pro ml Medium für jeden Stamm verursachte unterschiedliche spontane Häufigkeiten an Mutantenkolonien, die oft zu hoch oder zu gering sind. Daher soll in den weiteren Versuchen der benötigte Wuchsstoff in der günstigen Menge zugesetzt werden.

Unter den Auxotrophen gibt es "leaky" Mutanten; sie können auf wuchsstofffreiem Minimalagar noch etwas wachsen, wenn auch langsam. Der Block in der Synthesekette ist bei diesen Auxotrophen unvollständig, die nach der Mutation verbliebene geringe Enzymaktivität ermöglicht ein langsames Wachstum.

Die ausgewählten 3 Stämme wurden auf ihren Auxotrophiegrad durch Kultivieren in flüssigem Minimalmedium geprüft. Eventuell von den Zellen mitgeführte Nährstoffe aus dem vorherigen Medium wurden durch längeres Hungern auf Komplettagar ausgeschaltet. 19, 22 und 44 Stunden auf Komplettagar gewachsene Kulturen von den Stämmen arg⁻, gly⁻ und leu⁻ (zu verschiedenen Zeiten angesetzt, dann alle zur gleichen Zeit abgeimpft) wurden die Zelldichte 10^5 Zellen/ml in Minimalmedium eingestellt und bei 30°C im Rollbelüfter bebrütet. Nach 2, 8 und 22 Stunden wurden Proben entnommen und der Keimtiter in ihnen bestimmt. Aus dem Verlauf der Wuchskurven (Fig.2) ist ersichtlich:



Vorkultur auf Komplettagar :

x 19 Stunden

• 22 Stunden

▲ 44 Stunden

Fig. Nr.2

Wuchsverlauf von 3 auxotrophen *Serratia*-Stämmen in Minimallösung nach verschieden langer Hungerzeit (Vorkultur) auf Komplettagar.

- 1) der Stamm gly vermehrt sich nach einer Lag-Phase von 8 Stunden wieder.
- 2) der Stamm arg zeigt keinen Titerabfall und nur geringen Anstieg (auf das Doppelte) nach 22 Stunden.
- 3) der Stamm leu zeigt keine Teilung im Minimalmedium nach 22 Stunden Bebrütung.

Der Stamm leu kann also als vollauxotroph betrachtet werden, gly ist deutlich, arg schwach leaky. Das leaky-Wachstum der beiden letzten Stämme vereinfacht die Versuchstechnik; sie wachsen auf Minimalagar ohne Wuchsstoffzusatz zu unter dem Mikroskop sichtbaren Mikrokolonien, die für diese Versuche erforderlich sind (Restwachstum) und aus denen bei Ausplattung von etwa 10^7 Zellen/Platte ca. 100 - 200 Mutantenkolonien heranwachsen.

Für den Stamm leu mußte die Wuchsstoffmenge ermittelt werden, die etwa 100 Spontanmutantenkolonien pro Platte liefert. Ein Versuch mit 10^7 leu-Bakterien pro Platte bei gestaffelter Leucinzugabe in Minimalagar brachte nach 3 Tagen Bebrütung folgende Ergebnisse: Tabelle 4

T a b e l l e 4

Häufigkeit von Spontanmutationen pro 10^7 leu-Zellen in Abhängigkeit vom Wuchsstoffzusatz.

	Leucinzusatz in Minimalagar				
	0	0,1 μ /ml	0,5 μ /ml	1 μ /ml	5 μ /ml
Mutantenkoloniezahl pro Platte (je 4 Platten)	2, 1,	4, 5,	19, 28	85, 62	149, 220
	1, 2	4, 11	28, 37	103, 91	158, 133
Mittelwert:	1,5	6	28	85	165

In den weiteren Versuchen wurde ein Zusatz von 1 μ Leucin pro ml Medium für den Stamm leu verwendet, für die beiden anderen Stämme diente reiner Minimalagar.

3. 4.) Die spontane Mutabilität der Teststämme

Gut geeignet für Mutagenitätsprüfungen sind Stämme mit möglichst geringer spontaner Mutabilität. Je mehr auxotrophe Zellen der Chemikalienwirkung ausgesetzt werden, desto wahrscheinlicher ist auch geringe Zunahme der Prototrophiekolonien über die Spontanhäufigkeit nachweisbar.

Am besten wäre schon geringe Mutagenität festzustellen, wenn gar keine spontane Mutabilität vorhanden ist. Um jedoch sicher zu sein, dass der Stamm zur Rückmutation überhaupt befähigt ist und nicht etwa eine nichtrevertierbare Deletion oder dergleichen darstellt, muß geringe spontane Mutabilität vorhanden sein. Die spontane Mutabilität der ausgewählten 3 Stämme ist sehr gering; ihre Mutationsraten liegen in der Größenordnung von $1-8 \times 10^{-9}$ /Gener. (siehe Tabelle der Papillenmethode) und damit im niederen Bereich der Spanne bisher bekannter Raten von Anauxotrophiemutationen (z.B. Braun 1953; Sager und Ryan 1961).

Als spontaner Hintergrund wurde eine mühelos auszählbare Mutantenhäufigkeit von etwa 100 Kolonien pro Platte angestrebt, weil der statistische Fehler einer solchen Häufigkeit klein ist, sodaß ihre Erhöhung durch Mutagenität gut zu sichern ist. Diese hohe spontane Mutantenkoloniezahl entsteht durch Wachsen einer großen Zahl Elterzellen im "Restwuchs", sodaß zugleich für Einwirkung des Chemikals auf viele Zellen während der Teilungen gesorgt ist.

4.) Der modifizierte Blättchentest

4. 1.) Versuchstechnik der Blättchenmethode

Die Verwendung der Blättchenmethode als Mutagenitätstest und die fehlerstatistische Auswertung ihrer Ergebnisse wurde mit allen vorhandenen 36 Chemikalien an den ausgewählten 3 Stämmen gly, leu und arg genauer studiert.

Die Versuchstechnik war folgende: aus etwa 22 Stunden auf Komplettagar gewachsenen Kolonien wurde eine Suspension in

Saline vom Zelltiter 10^8 /ml (bzw. 2×10^8 /ml bei leu) hergestellt, 0,1 ml davon in 3 ml Weichagar von 48°C vermischt und sofort auf eine Grundschrift von 20 ml Agarmedium ausgeplattet. Das Medium bestand aus Minimalagar für die beiden leaky Stämme gly und arg, sowie Minimalagar mit $1 \mu\text{g/ml}$ Leucin für den vollauxotrophen Stamm leu. Auf die erstarrte Weichagarschicht wurde das sterile Blättchen placiert und darauf 0,1 ml der Testlösung aufgetragen. Als Lösungsmittel wurde sterile gepufferte Saline verwendet; ohne Chemikal wurde sie als Kontrolle auf einige Platten aufgeträufelt. Schwer in Wasser lösliche Stoffe, wie Acridin, β -Naphthylamin, Dibenzanthracen und Methylholanthren lösen sich gut in Aceton und wurden in dieser Lösung geprüft. Gleichzeitig wurde das Aceton auf Mutagenität gegenüber Saline untersucht. Geprüft wurden 2-3 Konzentrationsstufen 1:10 der Stoffe, ausgehend von der gesättigten Lösung oder Konzentration, die starke Wuchshemmung bewirkte oder auch als mutationsauslösend beschrieben war. Alle Chemikalien wurden bei Tageslicht gelöst, auf das Blättchen aufgeträufelt und nach etwa einer halben Stunde in den dunklen Brutraum gestellt. Nach 24-stündiger Inkubation bei 30°C war die Testlösung in das Agarmedium eingesaugt, so daß die Platten umgedreht und mit dem Boden nach oben weitere 3 Tage bebrütet werden konnten. Die Spontankontrolle umfaßte meist 7 Platten, für die Prüfung jeder Chemikalienkonzentration wurden 4-6 Platten verwendet.

Das Chemikal diffundiert aus dem Blättchen seitlich und senkrecht in das Medium und wirkt während des Wachses der Bakterien auf diese ein. Die Diffusionsgeschwindigkeit eines Chemikals hängt von den Konzentrationsdifferenzen sowie vom Diffusionskoeffizienten des Stoffes ab. Sie ist zu Beginn des Prozesses am höchsten, klingt dann nach und nach ab, bis ein Diffusionsausgleich erreicht ist; das Konzentrationsgefälle entspricht hierbei etwa dem Gauß'schen Wahrscheinlichkeitsintegral (Netter, 1959).

Bei aufgetragenen Farbstoffen, wie Fuchsin, Malachitgrün und Acriflavin konnte schon nach 40 Stunden Inkubationsdauer ein vom Blättchen ausgehender Gradient mit bloßem Auge beobachtet

werden, der sich während der restlichen Bebrütungszeit nicht merklich veränderte.

Über die Größe des Stofftransportes durch Diffusion in Agar und sein Einfluß auf den Bakterienwuchs ist bekannt, dass das Quadrat der Hemmzonenlänge in engen Röhrchen bei Streptomycin dem Logarithmus der Konzentration proportional ist (Linton 1958).

4. 2.) Fehlerstatistische Auswertung des Blättchentests

Nach Auszählung der meist roten Mutantenkolonien

- a) - auf der ganzen Plattenoberfläche und
- b) - in den Diffusionszonen

wurde eine Auswertung der Versuche mit fehlerstatistischen Methoden vorgenommen. Ob eine mit dem Teststoff behandelte Plattenreihe gesichert mehr Mutantenkolonien enthält als die Spontankontrolle ohne den Teststoff, jedoch mit dem Lösungsmittel, wird durch einen statistischen Vergleich beider Mittelwerte mit den dazugehörigen Schwankungen entschieden. (Signifikanzprüfung).

Auf einigen Testplatten bildeten manche (giftige) Substanzen einen Hemmhof um das Blättchen. Die Auswertung dieser Platten soll gesondert beschrieben werden.

4. 2. 1) Auswertung von Testplatten ohne Hemmhof

Eine Signifikanzprüfung ist mit verschiedenen statistischen Methoden möglich. Die Brauchbarkeit des χ -Tests, des t-Tests und der Streuungszerlegung wurde untersucht.

4. 2. 1. 1) Der χ -Test

Die einfachste Rechnung ist der χ -Test, der für Normalverteilung der Elementhäufigkeiten (in unserem Falle Mutationen) gilt. Er setzt jedoch Homogenität der Mutantenkoloniezahlen zwischen den Platten einer Plattenreihe, das heißt Normal-

oder Poissonstreuung, voraus.

$$+) \chi = \frac{\bar{M}_p - \bar{M}_{ch}}{\sqrt{\bar{M}_p + \bar{M}_{ch}}};$$

$\bar{M}_p$ = Mittelwert der Koloniezahlen der Spontankontrolle/Platte
 $\bar{M}_{ch}$ = Mittelwert der Koloniezahlen auf chemikalhaltigen Platten
 M_i = Mutantenkoloniezahl auf der i-ten Platte
 n = Anzahl der Platten
 $\bar{M} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n M_i$

Die den Versuchen zugrundeliegenden Stichproben waren groß, sie stellen die etwa 10^7 pro Platte aufgetragenen und dann weitergewachsenen Bakterien dar. Die daraus entstandenen Mutantenkolonien sind nach Poisson auf die Platten verteilt, und diese Verteilung entspricht bei etwa 100 Kolonien/Platte nahezu einer normalen. Die Anwendung des χ -Tests ist also bei den in den Versuchen vorliegenden Häufigkeiten von etwa 100 Kolonien pro Platte berechtigt.

In einer Plattenreihe weichen die Einzelwerte M_i oft mehr voneinander ab, als zufallsgemäß zu erwarten ist; das heißt die Mutationen sind auf die Platten nicht homogen verteilt. Da der χ -Test nur bei Homogenität der M_i -Werte exakte Ergebnisse liefert, ist zuvor eine Prüfung auf Homogenität nötig.

4. 2.1. 2) Homogenitätsprüfung

Die Homogenität der Mutantenkolonien einer Plattenreihe kann mit Hilfe

- a) des χ^2 -Tests geprüft werden. Es gilt, da die Mutantenzahlen M_i nach Poisson verteilt sind, d.h. seltene Ereignisse in sehr großen, gleichartigen Stichproben darstellen, die

Formel:

$$\chi_m^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(M_i - \bar{M})^2}{\bar{M}};$$

$\bar{M}$ = Mittelwert einer Plattenreihe
 M_i = Einzelwert einer Platte
 n = Anzahl der Platten
 $m=n-1$ = Zahl der Freiheitsgrade

- +) Alle hier aufgeführten mathematischen Formeln entstammen der von Herrn Professor R.W. Kaplan gehaltenen Vorlesung über Statistische Fehlerberechnung.

Das so berechnete Maß der Abweichung vom Mittelwert liefert aus Tafeln der χ^2 -Verteilung (z.B. Patau 1943) unter Berücksichtigung der Zahl der Freiheitsgrade m die Zufallswahrscheinlichkeit P . P ist die Wahrscheinlichkeit, in Stichproben unter den gleichen Bedingungen wie im Versuch bei reinem Zufall eine gleiche oder größere Abweichung zu erhalten als die gefundene. Bei einer Plattenreihe mit $P > 5\%$ ist die Verteilung der Koloniezahl als homogen anzusehen. Tabelle 5 zeigt das Beispiel einer Homogenitätsprüfung nach dem χ^2 -Test.

T a b e l l e 5

Homogenitätsprüfung der Mutantenkolonien einer
Plattenserie nach dem χ^2 -Test. (Ser.marco.gly)

Test	M_i	$M_i - \bar{M}$ $= \Delta$	Δ^2	$\Delta^2 / \bar{M}$	
1	94	+ 8,34	69,55	0,813	Die Verteilung der Mutantenkolonien auf die Platten ist <u>homogen</u> .
2	84	- 1,66	2,75	0,032	
3	97	+ 11,36	128,4	1,500	
4	76	- 9,66	93,31	1,090	
5	89	+ 3,34	11,15	0,130	
6	74	- 11,66	135,8	1,583	
$\Sigma = 514$			$\Sigma = 5,148 = \chi^2_5$	$P = 41\%$	
$\bar{M} = 85,66$					
1	118	- 0,2	0,04	0,0003	Die Verteilung der Mutantenkolonien auf die Platten ist <u>nicht homogen</u> .
2	110	- 8,2	67,24	0,568	
3	80	- 38,2	1459,2	12,310	
4	179	+ 60,8	3696,6	31,274	
5	104	- 14,2	201,64	1,718	
$\Sigma = 591$			$\Sigma = 45,870 = \chi^2_4$	$P = 10^{-9}$	
$\bar{M} = 118,2$					

Die Homogenitätsprüfung ist auch nach der (für Poissonstreuung)

- b) vereinfachten Formel⁺⁾ Snedecors durchführbar, die eine Umformung der obigen χ^2 -Formel (a) darstellt:

$$\chi^2_{i-1} = \frac{1}{\sum M_i} \left[\left(\sum M_i^2 \right) - \frac{1}{i} \left(\sum M_i \right)^2 \right] ; \quad M_i = \text{Koloniezahl/Platte} \\ i = \text{Anzahl der Platten}$$

Beide Methoden sind in der Berechnung recht umständlich.

- c) Eine Vereinfachung des Homogenitätsnachweises ist die Prüfung auf signifikanten Unterschied zwischen dem höchsten (M_1) und dem niedrigsten M_i -Wert (M_2) einer Plattenreihe nach dem χ -Test:

$$\chi = \frac{M_1 - M_2}{\sigma_\Delta} ; \quad \sigma_\Delta = \sqrt{G_1^2 + G_2^2} ; \quad G_i = \sqrt{M_i} ;$$

wobei die Streuungen der Einzelwerte G_i nach der Poissonstreuung berechnet wurden.

Die in Tabelle 6 verglichenen Ergebnisse der Homogenitätsprüfung nach dem χ^2 -Test mit der vereinfachten Snedecor-Formel sowie nach der χ -Methode zeigen in den meisten Fällen geringere P-Werte im χ -Test, da hier nur die beiden extremen Einzelwerte verwendet und nicht die Streuung aller Werte berücksichtigt wurde. Dieser χ -Test zeigt nur bei signifikanter Differenz zwischen M_1 und M_2 sichere Inhomogenität an; bei nicht außerzufälliger Differenz kann trotzdem Inhomogenität bestehen, sie wird allerdings meist nur gering sein.

+) Von Herrn Professor R.W. Kaplan vereinfacht.

Tabelle 6

Prüfung auf Homogenität der Mutantenkolonien einer Plattenserie nach der vereinfachten Snedecor-Formel und nach dem χ -Test zwischen dem höchsten und niedrigsten Plattenwert.
 $m = n - 1 = \text{Freiheitsgrade.}$

Versuch	Teststoff	m	χ^2_m	P	χ	P
136, leu	Kontrolle Fuchsin	6	59,47	10^{-10}	7,0	10^{-10}
		3	9,83	2,0%	3,05	0,27 %
121, gly	Kontrolle TEM	5	5,16	40 %	1,77	8,0 %
		4	45,56	10^{-9}	6,15	10^{-9}
123, gly	Kontrolle Hydrochinon	5	17,26	0,35%	3,16	3×10^{-5}
		4	48,60	5×10^{-10}	5,88	5×10^{-9}
135, leu	Kontrolle Alizaringelb	6	1,067	98,3 %	0,92	36 %
		4	17,325	0,2 %	3,56	5×10^{-4}

Inhomogenität zwischen den Platten einer Reihe kann verschiedene Ursachen haben, z.B. ungleiches Inoculum, ungleiche Mengen an Agarmedium und daher der Nährstoffe in den Platten, ungleichmäßige Belüftung der Platten, unterschiedlicher Feuchtigkeitsgrad des Agars infolge schlecht schliessender Deckeln u.v.a.

Die oben diskutierte Homogenitätsprüfung soll darüber entscheiden, ob die Streuung des Mittelwertes $\bar{M}$ einer Plattenreihe zufallsgemäß ($P > 5\%$) ist und nach der Poissonstreuung:

$$G\bar{M} = \pm \frac{\sqrt{\sum M_i}}{n} = \sqrt{\frac{\bar{M}}{n}} ; \quad \text{berechnet werden kann oder nicht.}$$

Bei außerzufälliger Streuung, also bei Inhomogenität wird der nach Poisson berechnete Fehler ungenau (zu klein), dagegen liefert die umständlicher zu berechnende Standardabweichung:

$$s_{\bar{M}} = \pm \sqrt{\frac{\sum (M_i - \bar{M})^2}{n \cdot (n-1)}} ; \quad \text{zuverlässige Werte. Die in}$$

Tabelle 7 zusammengestellten Beispiele lehren, dass bei homogener Verteilung der M_i -Werte

die Poissonstreuung G_M eine ausreichende Schätzung der Fehler ist. bei nicht zufallsgemäß abweichenden Plattenwerten dagegen gibt die Standardabweichung die größere und damit die genauere Streuung an.

T a b e l l e 7

Berechnung der Streuung um den Mittelwert in homogenen und nichthomogenen Plattenreihen.

Versuch	Testsubstanz	Homogenität (nach χ -Test)	$\bar{M}$	$G_M = \pm \sqrt{\frac{\bar{M}}{n}}$	$s_M = \pm \sqrt{\frac{\sum (M_i - \bar{M})^2}{n(n-1)}}$
135, leu	Kontrolle	36 %	86,42	3,52	1,48
	Alizaringelb	5×10^{-4}	90,80	4,25	8,86
	Malachitgrün	28 %	70,80	3,76	2,87
123, gly	Alizaringelb	0,1 %	153,75	6,00	13,20
	Pyrogallol	3,5 %	226,0	6,72	7,58
	Na-D-cholat	0,6 %	144,2	5,36	8,38
115, arg	Kontrolle	10^{-10}	181,0	6,02	28,50
	H ₂ O ₂	3×10^{-5}	193,2	6,95	17,20
	NaNO ₂	10^{-10}	152,6	5,53	30,80
134, leu	N-Lost	9 %	109,75	5,26	5,21
	BU	30 %	78,0	3,95	2,42

4. 2.1. 3) Der t - Test

Der t-Test wird bei kontinuierlichen Variablen als Signifikanzprüfung zwischen bei Mittelwerten angewandt. Er gilt auch bei Inhomogenität innerhalb einer Versuchsreihe; der Fehler der Mittelwerte wird nach der mittleren quadratischen Abweichung (Standardabweichung) berechnet.

$$t_m = \frac{\bar{M}_{sp} - \bar{M}_{ch}}{\sqrt{s_{M_{sp}}^2 + s_{M_{ch}}^2}} ; \quad s_M = \pm \sqrt{\frac{\sum (M_i - \bar{M})^2}{n(n-1)}} \quad m = n_{sp} + n_{ch} - 2 =$$

Zahl der Freiheitsgrade.

Da die M_1 -Werte in den geprüften Plattenreihen groß sind (≈ 100) und daher fast kontinuierlich variieren, kann der

t-Test als Näherung verwendet und auf Brauchbarkeit bei inhomogenen Fällen geprüft werden.

4. 2.1. 4) Die Streuungszerlegung

Der genaueste Signifikanztest ist die Streuungszerlegung. Sie ist auch dann anwendbar, wenn die Streuung in einer oder allen Plattenreihen außerzufällig groß ist. Die Streuungszerlegung wurde mit dem χ^2 -Test vorgenommen: aus der "Totalstreuung" beider verglichenen Plattenreihen um den gemeinsamen Mittelwert und den "Binnenstreuungen" um die Mittelwerte der einzelnen Plattenreihen wurde die Streuung zwischen den Plattenreihen durch Subtraktion dieser von jener berechnet und auf Zufälligkeit geprüft.

$$\chi^2_{m_1+m_2+m_3 \text{ total}} = \chi^2_{m_1 \text{ Kontrollpl.}} + \chi^2_{m_2 \text{ Testpl.}} + \chi^2_{m_3 \text{ zwischen Kontroll- u. Test- Plattenreihe}} (=K/\text{ch})$$

$$\chi^2_{m_3} (K/\text{ch}) = \chi^2_{m_1+m_2+m_3 \text{ total}} - [\chi^2_{m_1} K + \chi^2_{m_2} \text{ch}]$$

4. 2.1. 5) Auswahl eines geeigneten Signifikanztests

Von den beschriebenen 3 Signifikanztests ist die χ^2 -Zerlegung ohne Rücksicht auf Inhomogenität immer exakt, sie ist jedoch langwierig in der Berechnung. Es wurde untersucht, ob die Anwendung der Streuungszerlegung sich nicht durch eine der beiden Näherungen, den χ -Test oder den t-Test ersetzen ließe. Zu diesem Zweck wurden die mit den 3 obigen Methoden am gleichen Versuchsmaterial berechneten Ergebnisse miteinander verglichen. Beim χ -Test wurde die Streuung der Mittelwerte σ_m nach der Poissonstreuung berechnet, auch wenn keine Homogenität zwischen den Platten vorhanden war, um diese Vereinfachung zu prüfen.

Tabelle 8 enthält die Resultate der 3 Signifikanzteste von Versuchen mit Homogenität

a) in beiden verglichenen Plattenreihen,

Tabelle 8

Prüfung auf Signifikanz nach verschiedenen statistischen Methoden an Plattenreihen mit unterschiedlicher Homogenität.

	Stamm	Mutagenitäts- Testsubstanz	Plattenreihe			Signifikanztests		
			Σm_i	n	Homogenität nach χ^2	χ^2 -Zerlegung	χ	t
a	gly	Kontrolle	264	5	P = 18 %			
		Äthylen-10 ⁻³	295	5	40 %	P = 18 %	P = 19%	P = 17%
		imin 10 ⁻⁴	324	5	50 %	1,2%	1,4%	1,6%
	leu	Kontrolle	597	7	93 %			
		MnCl ₂ 10 ⁻² m	450	4	87 %	5x10 ⁻⁶	2x10 ⁻⁵	2x10 ⁻⁴
	arg	Kontrolle	1109	7	40 %			
b		ATU ges.L.	910	4	78 %	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹⁰	<10 ⁻⁴
	leu	Kontrolle	605	7	98 %			
		Aliz.-gelb ges.L.	454	5	0,2 %	31 %	42%	66 %
	gly	Kontrolle	514	6	40 %			
		BU 10 ⁻² ges.L.	434	5	0,9 %	75 %	84%	90 %
	arg	Kontrolle	1820	7	3x10 ⁻⁶			
		Azaguanin ges.L.	1260	5	40 %	24 %	36%	65 %
	gly	Kontrolle	783	6	0,35 %			
		Na-D-cholat 0,1%	594	4	62 %	1,7 %	1,8%	10 %
	arg	Kontrolle	944	6	15 %			
		Acriflavin 10 ⁻² ges.L.	700	4	4x10 ⁻⁴	2,0 %	3,2%	35 %
	gly	Kontrolle	862	7	13 %			
c		NaNO ₂ 10 ⁻⁴ m	908	5	2x10 ⁻⁶	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	0,85%
	leu	Kontrolle	427	5	0,2 %			
		β-Propiolaktol 10 ⁻¹	605	5	30 %	5x10 ⁻⁸	5x10 ⁻⁸	1,4 %
	arg	Kontrolle	944	6	15 %			
		Contergan 1:1000	1014	5	10 ⁻⁷	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	5,5 %
	arg	Kontrolle	905	5	10 ⁻¹⁰			
		H ₂ O 10 ⁻³	773	4	4x10 ⁻⁴	58 %	18%	72 %
		EMS 10 ⁻²	976	5	10 ⁻¹⁰	44 %	18%	72 %
	leu	Kontrolle	601	7	10 ⁻¹⁰			
		Fuchsin 10 ⁻² ges.L.	418	4	2,0 %	1,0 %	0,27%	22 %
	arg	Kontrolle	905	5	10 ⁻¹⁰			
		TEM 0,01%	2130	5	10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	1,4 %
		Äthylureth ges.L.	1750	5	10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	42 %
	gly	Kontrolle	763	6	0,35 %			
		Aliz.-gelb ges.L.	792	4	0,20 %	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹⁰	0,7 %
		" 10 ⁻¹ ges.L.	615	4	0,35 %	0,13 %	0,2 %	17 %
	arg	Kontrolle	560	4	10 ⁻¹⁰			
		Äthylenimin 10 ⁻⁴	1424	4	10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	40 %

a = Homogenität in beiden verglichenen Plattenreihen

b = Homogenität nur in einer der beiden Plattenreihen

c = Homogenität in keiner der beiden verglichenen Plattenreihen.

- b) nur in einer der beiden Plattenreihen (entweder in der Kontrollreihe oder in der Testreihe).
- c) in keiner der verglichenen Plattenreihen (beide inhomogen).

Betrachtet wurden hierbei die Testreihen mit nichtsignifikantem ($P > 5\%$), wahrscheinlichem ($5\% > P > 1\%$) und signifikantem ($P < 1\%$) Unterschied. In allen Fällen ist eine ausreichende Übereinstimmung der P-Werte nach χ^2 -Zerlegung und nach dem χ -Test vorhanden, nach dem t-Test jedoch nur bei Homogenität in den verglichenen Plattenreihen, sonst ergibt er zu hohe P-Werte. Der t-Test ist also für eine Signifikanzprüfung zu unsensibel, da aufgrund χ^2 -Zerlegung sicher vorhandene Mutagenität, z.B. mit Alizarinorange bei gly, Äthylurethan bei arg, Fuchsin bei leu, durch den t-Test nicht nachzuweisen war. Der χ -Test mit Fehlerberechnung nach Poisson dagegen ist auch bei Inhomogenität der M_1 -Werte brauchbar; er stellt eine große Vereinfachung der Berechnung dar und liefert dennoch richtige Schlüsse auf Signifikanz. Offenbar sind die in den Versuchen auftretenden Platteninhomogenitätsgrade fast immer zu klein, um sich auf die durch Mutagenität erzeugten Differenzen der Mutantenzahlen erheblich auszuwirken.

Daraus ergibt sich die Folgerung, dass Inhomogenität in den Plattenreihen ein Störfaktor ist, der vorhandene Mutagenität, wohl nur bei starker Inhomogenität, verbergen könnte. In der Versuchstechnik sollte natürlich die Inhomogenität durch Verwendung gleicher Agarmengen in den Platten, gut sitzender Deckel, gleichzeitige Herstellung und gleichlange Aufbewahrung der Platten, einheitliche Bebrütungstemperatur u.s.w. möglichst gering gehalten oder ganz ausgeschaltet werden.

4.2. 2.) Auswertung von Hemmhoopplatten

Schwierig ist die Auswertung von Platten mit einer durch Giftwirkung des Stoffes verursachten Hemmzone um das Blättchen. Denn diese Zone fällt für die Ausbildung von Mutantenkolonien

aus und die Anzahl der Kolonien auf dem nichtgehemmten Plattenteil kann daher trotz Mutagenität unter dem Kontrollwert liegen. Die Mutantenkoloniezahl einer Platte mit Hemmhof kann daher nur mit derjenigen der Spontankontrollplatte von gleicher Wuchsfläche verglichen werden.

4.2.2. 1.) Auswertung des nichtgehemmten Plattenteils

Auf einer Hemmhofplatte hebt sich der klarbleibende Hemmhof deutlich vom Hintergrundwachstum des nichtgehemmten Plattenteils ab und ist somit gut meßbar. Die Fläche des Hemmhofes bezogen auf die gesamte Agaroberfläche der Platte ergibt den Hemmfaktor h ,

$$\frac{F_{\text{Hemmhof}}}{F_{\text{Gesamtplatte}}} = h, \quad \text{daraus ist } 1-h = f, \quad \text{der hemmungs-} \\ \text{freie Anteil der Agarfläche.}$$

Die Auswertung von Hemmhofplatten kann auf mehrfache Art vorgenommen werden. Einmal z.B. durch Bestimmung der durchschnittlichen Fläche des Hemmhofes, etwa mit Hilfe eines Planimeters und Berechnung von f . Der mit dem Faktor f einer Hemmhofplattenreihe multiplizierte Mittelwert der Spontankontrolle $\bar{M}_{sp}$ (wobei dessen ursprünglicher Fehler $\bar{G}\bar{M}$ beibehalten wird, weil $\bar{M}$ um f verkleinert wurde, nicht aber die M_1 , aus denen $\bar{G}$ berechnet ist), kann nun mit dem Mittelwert der gifthaltigen Platten $\bar{M}_{ch}$ mit Hilfe des χ -Tests auf signifikanten Unterschied geprüft werden.

Bei einer anderen Art der Auswertung werden die Gift- und Spontanplatte übereinandergelegt und der durchsichtige Hemmhof auf der letzteren nachgezeichnet. Die Schwankungen der Hemmhöfe werden durch das Nachzeichnen auf Spontanplatten übertragen, die ihrerseits ungleiche Koloniezahlen enthalten. Dadurch entsteht natürlich eine relativ große Streuung der gewonnenen Daten. Aus diesem Grund wird die Streuungszerlegung angewendet, die auch bei großen Streuungen in den Plattenserien eine sichere Signifikanzprüfung zuläßt. Aber auch die Signifikanzprüfung nach dem χ -Test kann hier angewandt werden; sie brachte der Streuungszerlegung sehr ähnliche Ergeb-

nisse. Die Methodik des nachgezeichneten Hemmhofes und der Auswertung nach χ^2 -Zerlegung und dem χ -Test wurden in den beschriebenen Versuchen gebraucht. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 10 und 11 (s.u.) wiedergegeben.

4. 2.2. 2.) Auswertung der Diffusionszonen auf Hemmhofplatten

Auf Hemmhofplatten einiger Teststoffe wurde in den ersten, blättchennahen Zonen des bewachsenen Plattenteiles eine grössere Zahl von Mutantenkolonien gefunden. Dies deutet auf stark konzentrationsabhängige Mutationsauslösung. Die Auswertung der mutagenitätsverdächtigen Zone auf allen Testplatten geschah durch einen statistischen Vergleich ihres Zonenmittelwertes $\bar{X}_{ch}$ mit dem Zonenmittelwert der Spontankontrollplatten $\bar{X}_{sp}$.

Der Zonenmittelwert der Testplattenreihe ergab sich aus:

$\bar{X}_j = \frac{\sum X_{ij}}{n}$; sein Fehler wurde aus der mittleren quadratischen Abweichung berechnet:

$$s_{\bar{X}} = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}};$$

X_{ij} = Zoneeinzelwert in Zone j.
 $\bar{X}_j$ = Mittelwert einer bestimmten Zone aus allen Testplatten.
 n = Anzahl der Zonenfelder in einer Plattenreihe mit X_{ij} ,
 j = die ausgewertete Zone von den Diffusionszonen I - V.

Auf Spontankontrollplatten sind die Kolonien etwa gleichmässig über alle Zonen verteilt. Der Zonenmittelwert $\bar{X}_{sp}$ wurde daher aus den Werten der Zonenfelder (meist 30-35) aller Zonen und aller Spontanplatten, der Fehler dazu nach der Standardabweichung berechnet.

Die errechneten Mittelwerte $\bar{X}_{sp} \pm s_{\bar{X}_{sp}}$ und $\bar{X}_{ch} \pm s_{\bar{X}_{ch}}$ wurden nach dem χ -Test und nach dem t-Test auf Signifikanz geprüft. Ein Beispiel zeigt die Auswertung von Hemmhofplatten (Tab. 9).

T a b e l l e 9

Auswertung eines Blättchentests mit Formaldehyd
und β -Propiolakton an Ser.mar., gly
(2×10^7 Zellen/Platte auf Minimalagar ohne Wachstoffsstoff).

Testochemikal	M_i	davon in Zonen					
		I	II	III	IV	V	
Spontan- kontrolle	86	3	3	4	4	3	
	70	4	5	4	1	4	
	100	5	3	2	3	3	
	101	3	3	6	4	3	
	75	6	5	4	5	3	
	$\bar{M} \pm \bar{G}_M \pm$	86,4 4,15	$\bar{X} \pm s_{\bar{X}} = 3,72 \pm 0,234$				
F.	10^{-2}	145	0	13	7	4	5
		94	0	7	5	7	5
		149	0	18	11	3	5
		175	0	14	15	6	4
		165	0	16	7	8	4
	$\bar{M} \pm \bar{G}_M \pm$	145,6 5,39	0	13,6	9,0	5,6	4,6
	10^{-3}	88	3	2	2	7	1
		116	5	3	5	6	4
		102	5	3	3	6	6
		73	1	7	2	4	7
		79	5	5	4	3	1
	$\bar{M} \pm \bar{G}_M \pm$	91,6 4,28	3,8	4,0	3,2	5,2	3,8
β -Propio- lakton	10^{-1}	77	0	6	7	2	2
		58	0	5	3	3	4
		68	0	4	5	5	5
		61	0	3	5	3	1
		63	0	3	2	0	4
	$\bar{M} \pm \bar{G}_M \pm$	65,4 3,62	0	4,2	4,4	2,6	3,2

Koloniezahlen auf
der Fläche der
Spontanplatten, die
dem ungehemmten
Teil der Chemikal-
platten entspricht
(= Kontr. f)

$$65,2 \pm 3,61$$

$$f = \frac{65,2}{86,4} = 0,755$$

$$f = \frac{64,8}{86,4} = 0,750$$

$$64,8 \pm 3,60$$

Der Anteil der ungehemmten Fläche f auf den Hemmhofplatten
($F 10^{-2}$ und β -Propiolakton 10^{-1}) wurde aus den Kolonie-
zahlen der entsprechenden Spontanplattenflächen berechnet.

Fortsetzung der Tabelle 9

Homogenität der Koloniezahl / Platte (= M_i):

Kontrolle : $\chi^2 = 9,15_4$; P = 5,5 %

F, 10⁻² : $\chi^2 = 29,9_4$; P = 2 x 10⁻⁵

F, 10⁻³ : $\chi^2 = 13,3_4$; P = 1,0 %

Kontr.f (F): $\chi^2 = 4,60_4$; P = 34 %

β -Propiolakt.: $\chi^2 = 3,39_4$; P = 50 %

Kontr.f(β -Prop): $\chi^2 = 5,28_4$; P = 24 %

Signifikanzprüfung der M_i-

a) ohne Hemmzonenberücksichtigung: nach dem χ -Test

F, 10⁻² : $\frac{145,6 \pm 5,39}{86,4 \pm 4,15}$ $\chi = \frac{59,2}{6,8} = 8,72$; P = < 10⁻¹⁰
 $\Delta = 59,2 \pm 6,80$

F, 10⁻³ : $\chi = \frac{5,2}{5,95} = 0,875$; P = 40 %

β -Prop., 10⁻¹: $\frac{86,4 \pm 4,15}{65,4 \pm 3,62} = \text{Kontr.}$
 $\Delta = 21,0 \pm 5,50$ $\chi = \frac{21,0}{5,5} = 3,8$; P = 10⁻⁴ unter dem Kontrollwert (=u.K.)

b) mit Berücksichtigung der Hemmzone:

	χ^2 - Zerlegung	χ - Test
F, 10 ⁻² :	$\chi^2_{f.K/F} = 193,56_9 - 31,5_8 = 162,06_1$; P = < 10 ⁻¹⁰	$\chi = 12,36$; P = < 10 ⁻¹⁰
β -Prop 10 ⁻¹ :	$\chi^2_{f.K/ \beta Pr.} = 8,67_9 - 8,66_8 = 0,01_1$; P = 92 %	$\chi = 0,118$; P = 91 %

Fortsetzung der Tabelle 9

Signifikanzprüfung der Zonenwerte x_{1-}

a) mit dem t-Test :

Spontankontrolle: $\bar{X} \pm s_{\bar{X}} = 3,72 \pm 0,234$

$F, 10^{-2}$, Zone II : $13,6 \pm 1,86$; $t_{28} = \frac{9,86}{1,86} = 5,31$; $P = < 10^{-4}$

Zone III : $9,0 \pm 1,79$; $t_{28} = 2,93$; $P = 7 \times 10^{-3}$

Zone IV : $5,6 \pm 0,93$; $t_{28} = 1,98$; $P = 6 \%$

β -Propl., Zone III : $4,4 \pm 0,87$; $t_{28} = 0,755$; $P = 45 \%$

b) nach dem χ -Test (ohne Berücksichtigung der Inhomogenität)

Spontankontrolle: $\bar{X} \pm s_{\bar{X}} = 3,72 \pm 0,385$

$F, 10^{-2}$, Zone II : $13,6 \pm 1,65$; $\chi = \frac{9,9}{1,7} = 5,8$; $P = 10^{-8}$

Zone III : $9,0 \pm 1,34$; $\chi = 3,78$; $P = 10^{-4}$

Zone IV : $5,6 \pm 1,06$; $\chi = 1,66$; $P = 10 \%$

β -Propl., 10^{-1} : Zone III: $4,4 \pm 0,937$; $= 0,62$; $P = 54 \%$

Die rechnerische Auswertung aus Tabelle 9 führt zu folgenden Ergebnissen:

1.- die Signifikanzprüfung ohne Berücksichtigung des Hemmhofes zeigt bei Formaldehyd dennoch einen signifikanten Unterschied, bei β -Propiolakton erscheint der Mittelwert weit unter der Kontrolle ($P = 10^{-4}$).

2.- unter Berücksichtigung des Hemmhofes ist der Unterschied bei β -Propiolakton insignifikant, bei Formaldehyd noch signifikanter.

3.- in den Zonen II und III der Formaldehydhemmhofreihe konnte unter Vernachlässigung der vorliegenden Inhomogenität mit dem χ -Test und Poissonstreuung Mutagenität ($P = 10^{-8}$; $P = 10^{-4}$) gesichert werden; in β -Propiolakton-haltigen Platten war keine Erhöhung von Zonenmittelwerten nachzuweisen.

4.- ähnliche Ergebnisse (wie in 3.) wurden an den gleichen Werten mit dem t-Test bei Standardabweichung erzielt, so daß die einfachere Berechnung nach dem χ -Test für den Nachweis der Zonenmutagenität ausreicht.

5.- die stärkste Erhöhung der Koloniezahl in der Zone nächst dem Hemmhof (Zone II, F, 10^{-2}) und der allmähliche Abfall in den nächstfolgenden Zonen offenbart eine konzentrationsabhängige Mutagenität bei Formaldehyd.

Der in Tabelle 9 ersichtliche Befund, dass bei signifikant vermehrter Koloniezahl in einer (oder mehreren) Zone die Gesamtkoloniezahl auf der Hemmhofplatte ebenfalls erhöht ist, konnte auch bei anderen Mutagenen bestätigt werden (Tabelle 10). Die um den Hemmhof herum häufiger auftretenden Mutantenkolonien erhöhen ja gleichzeitig die Gesamtkoloniezahl (M_1) auf der Platte.

Tabelle 10

Resultate der Platten- und Zonenauswertung von giftgehemmten Testplatten.

Teststoff	gly			arg			leu		
	f	P von M_1	erhöhte X_i	f	P von M_1	erhöhte X_i	f	P von M_1	erhöhte X_i
HgCl ₂ 10 ⁻² _m	0,60	37 %	—	0,45	30 %	—	0,62	36 %	—
10 ⁻³ _m	0,80	4,5%	—	--	--		--	--	--
F 10 ⁻²	0,75	10 ⁻¹⁰	+	0,70	u.K.	—	0,75	10 ⁻¹⁰	+
β-Prop. 10 ⁻¹	0,75	92 %	--	0,67	79 %	--	0,90	5x10 ⁻⁸	+
Hydro- chinon ges.L.	0,66	u.K.	—	--	--		--	--	--
10 ⁻¹ ges.L.	0,75	5x10 ⁻⁷	-(P=5%)	0,71	u.K.	—	1,0	41 %	—
Pyro- gallol ges.L.	0,67	10 ⁻¹⁰	+	0,20	u.K.	—	0,85	85 %	—

f - berechnet wie in Tabelle 9

Aus den Ergebnissen der Tabellen 9 und 10 ergibt sich die Folgerung für die Auswertung von Hemmhofplatten:

- 1) Die Auswertung der Diffusionszonen bewährt sich nicht, da bei erhöhter Koloniezahl in ihnen die Plattenauswertung ebenfalls Signifikanz aufweist. Auch ist die Fläche der Zonen und damit die darin gezählte Koloniezahl meist zu klein, so daß sie nur selten eine klare Entscheidung über Mutagenität zulassen, wie z.B. im Falle der Formaldehydwirkung (Tabelle 9). Die Fälle, in denen die Zonenmittelwerte schon eine signifikante Mutagenität anzeigen, nicht jedoch die Gesamtwerte M_1 bzw. $\bar{M}$ (z.B. infolge eines großen Hemmhofes) sind sicher selten. Sie sind bei stark giftigen Stoffen mit engem Konzen-

trationsbereich der Mutagenität zu erwarten. Im hiesigen Material trat kein solcher Fall auf. (Tabelle 10).

2) Zwar hat sich die auf Hemmhoofplatten gefundene starke Mutagenität auch ohne Berücksichtigung der Hemmzone (auf den Kontrollplatten) sichern lassen (z.B. Formaldehyd in Tabelle 9), bei schwacher Mutagenität jedoch (ein solcher Fall wurde nicht gefunden) könnte die Koloniezahl dem Kontrollwert gleichen, oder sogar unter ihm liegen, was tatsächliche Mutationsauslösung nicht erkennen ließe. Für die richtige Signifikanzbeurteilung auch schwach mutagener oder nichtmutagener Stoffe (z.B. β -Propiolakton in Tabelle 9) ist ein Vergleich mit der auf entsprechend (um den Faktor f) verkleinerten Fläche der Kontrollplatten gewachsenen Koloniezahl notwendig. Die Ergebnisse der Hemmhoofplatten in den Tabellen 10 und 11 (s.u.) wurden auf diese Weise berechnet.

4.3.) Ergebnisse der Blättchentestversuche

Die aus allen Blättchentesten berechneten Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefaßt. Berücksichtigt ist hier nur die Auswertung der ganzen Platte (M) und nicht der Zonen (x). Die in Tabelle 10 aufgeführten Hemmhoofplattenreihen wurden mit auf entsprechender Wuchsfläche der Kontrollplatten gefundenen Mutantenkoloniezahlen verglichen.

Die Tabelle 11 enthält Angaben über das geprüfte Chemikal nebst Konzentration, die Anzahl n der Platten in der Testreihe und der Kontrolle, die Homogenität nach χ^2 innerhalb der Plattenreihe. Das $\chi^2_{K/oh}$ wurde in allen Flächen nach der beschriebenen χ^2 -Zerlegung berechnet. Daneben wurde auch eine Signifikanzprüfung nach dem χ -Test (mit Poissonstreuung und ohne Berücksichtigung von Inhomogenität) vorgenommen; die so gewonnenen P-Werte sind in der nächsten Spalte der Tabelle 11 enthalten. "u.K." (= unter dem Kontrollwert) bedeutet, dass $\bar{M}$ der Testplatten signifikant unter der Spontankontrolle liegt.

Tabelle 11 : Ergebnisse der mit d
Mutagenitätsversuche

Lfd. Nr.	Testsubstanz	gly ₁ ⁻						
		ΣM_1	n	Homo- genität	$\chi^2 K/eh$	P_2 χ^2 -Zerl.	P_1 χ	ΣM_1
1	NaNO ₂	Kontrolle	862	7	P=13 %			905
		10 ⁻² m						540
		10 ⁻³ m	586	5	23 %	0,93	33 %	763
		10 ⁻⁴ m	908	5	2x10 ⁻⁶	73,65	10 ⁻¹⁰	
2	MnCl ₂	Kontrolle	1602	7	5,0 %			1109
		1 m	1032	5	46 %	7,03	u.K.	1011
		10 ⁻¹ m	1202	5	54 %	1,43	22 %	
		10 ⁻² m	1092	5	5x10 ⁻⁵	1,02	30 %	747
3	HgCl ₂	Kontrolle	862	7	13 %			944
		10 ⁻² m	330	5	10 ⁻⁴	0,79	37 %	356
		10 ⁻³ m	553	5	0,1 %	3,94	4,5 %	
		10 ⁻⁴ m					8 %	628
4	H ₂ O ₂	Kontrolle	264	5	18 %			905
		10 ⁻² m	185	5	7 %	12,61	u.K.	368
		10 ⁻³ m	232	5	98 %	2,13	14 %	773
		10 ⁻⁴ m					15 %	
5	Hydroxylamin	Kontrolle	432	5	5,5 %			944
		10 ⁻² m	442	5	60 %	0,11	74 %	800
		10 ⁻³ m	425	5	46 %	0,19	66 %	
		10 ⁻⁴ m					80 %	829
6	Formaldehyd	Kontrolle	432	5	5,5 %			944
		10 ⁻² m	728	5	2x10 ⁻⁵	162,1	<10 ⁻¹⁰	561
		10 ⁻³ m	458	5	1,0 %	0,85	36 %	
		10 ⁻⁴ m					40 %	660
7	β -Propiolakton	Kontrolle	432	5	5,5 %			944
		10 ⁻¹ m	327	5	50,0 %	0,009	96 %	538
		10 ⁻² m	448	5	78 %	0,21	65 %	
		10 ⁻³ m	425	5	48 %	0,21	65 %	795

Stättchentest durchgeführten
auxotrophen *Serratia*-Mutanten

arg ₁ ⁻				leu ₁ ⁻					
Homo- genität	$\chi^2_{K/ch}$	P ₂ - χ^2 -Zerl.	P χ	ΣM_i	n	Homo- genität	$\chi^2_{K/ch}$	P ₂ - χ^2 -Zerl.	P χ
=10 ⁻¹⁰				420	7	P= 91 %			
x10 ⁻⁵	107,5	u.K.	u.K.	282	5	90 %	0,65	42 %	42 %
10 ⁻¹⁰	8,9	u.K.	u.K.	254	5	90 %	4,44	3,5 %	3,2 %
40 %				597	7	93 %			
0,2 %	33,34	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	373	4	26 %	2,0	16,0 %	19 %
x10 ⁻⁹	21,31	4x10 ⁻⁵	7x10 ⁻⁵	450	4	87 %	20,54	5x10 ⁻⁶	2x10 ⁻⁵
15 %				597	7	93 %			
68 %	0,01	92 %	97 %	283	5	46 %	0,82	36 %	40 %
x10 ⁻⁶	16,20	u.K.	u.K.	441	5	30 %	0,35	56 %	66 %
10 ⁻¹⁰				420	7	91 %			
x10 ⁻⁷	249,4	u.K.	u.K.	194	5	60 %	23,4	u.K.	u.K.
x10 ⁻⁴	0,30	58 %	18 %	233	5	22 %	9,06	u.K.	u.K.
15 %				420	7	91 %			
36 %	0,09	76 %	73 %	235	5	17 %	8,97	u.K.	u.K.
10 ⁻¹⁰	3,5	6,0 %	27 %	245	5	26 %	6,37	u.K.	u.K.
15 %				352	7	30 %			
60 %	8,81	u.K.	u.K.	670	5	1,0 %	241,1	<10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹⁰
0,0 %	11,56	u.K.	u.K.	238	5	40 %	0,41	52 %	50 %
15 %				601	7	10 ⁻¹⁰			
12 %	0,07	79 %	81 %	605	5	30 %	29,6	5x10 ⁻⁸	5x10 ⁻⁸
40 %	0,01	92 %	82 %	439	5	14 %	0,05	82 %	73 %

Lfd. Nr.	Testsubstanz	gly ₁ ⁻							Σ M _i
		Σ M _i	n	Homo- genität	χ ² _{K/ch}	P χ ² -Zerl.	P χ		
8	Kontrolle	560	5	7,5 %				1825	
	Essigsäure 10 ⁻²							1382	
	10 ⁻³	632	5	28 %	4,12	4,0 %	3,5 %		
	10 ⁻⁴	574	4	19 %	17,19	3x10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	1300	
9	Kontrolle	560	5	7,5 %				905	
	Äthylurethan ges.L.	588	5	28 %	0,83	48 %	40 %	1269	
	10 ⁻¹ ges.L.	576	5	10 %	0,19	66 %	64 %	1750	
	10 ⁻² ges.L.	522	4	28 %	6,08	1,3 %	0,12 %	1424	
10	Kontrolle	560	5	7,5 %				1825	
	N-Methyl- urethan 10 ⁻¹							1284	
	10 ⁻²	547	4	14 %	10,85	0,1 %	8x10 ⁻⁴		
	10 ⁻³	651	5	96 %	6,23	1,2 %	0,8 %	1105	
11	Kontrolle	432	5	5,5 %				560	
	Diäthylsulfat 10 ⁻¹	460	5	31 %	0,69	40 %	36 %	1957	
	10 ⁻²	472	5	32 %	1,69	20 %	18 %	1387	
	10 ⁻³	412	5	8,0 %	0,81	35 %	48 %		
12	Kontrolle	264	5	18 %				905	
	Äthyl- methan- sulfonat = EMS 10 ⁻²	228	5	52 %	2,51	11 %	10 %	976	
	10 ⁻³	267	5	27 %	0,01	92 %	71 %	1656	
	10 ⁻⁴	353	5	1,0 %	14,0	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	1587	
13	Kontrolle	783	6	0,35 %				2810	
	Hydrochinon ges.L.	277	5	10 ⁻⁵	31,30	u.K.	u.K.		
	10 ⁻¹ ges.L.	638	5	10 ⁻¹⁰	25,62	5x10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	1186	
	10 ⁻² ges.L.	693	5	94 %	1,63	20 %	24 %	2346	
14	Kontrolle	783	6	0,35 %				2810	
	Pyrogallol ges.L.	353	5	50 %	15,86	7x10 ⁻⁵	6x10 ⁻⁵		
	10 ⁻¹ ges.L.	828	5	50 %	120,4	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	315	
	10 ⁻² ges.L.	1150	5	28 %	138,3	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	2326	
15	Kontrolle	560	5	7,5 %				1825	
	Pikrinsäure ges.L.	583	4	17 %	19,66	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	125	
	10 ⁻¹ ges.L.	483	4	84 %	1,22	27 %	23 %		
	10 ⁻² ges.L.	940	5	32 %	95,19	10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	1236	

arg ₁ -					leu ₁ -					
	Homo- genität	$\chi^2_{K/ch}$	χ^2 -Zerl.	P χ	ΣM_1	n	Homo- genität	$\chi^2_{K/ch}$	χ^2 -Zerl.	P χ
7	3x10 ⁻⁶				587	7	90 %			
5	7x10 ⁻⁵	2,70	10 %	10 %	416	5	64 %	0,009	92 %	91 %
5	10 ⁻⁵	0,07	80 %	94 %	421	5	92 %	0,008	94 %	95 %
5	10 ⁻¹⁰				420	7	91 %			
5	10 ⁻¹⁰	127,2	<10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹⁰	256	5	34 %	3,79	u.K.	u.K.
5	10 ⁻¹⁰	152,27	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰						
4	5x10 ⁻⁷	238,12	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	267	5	29 %	2,25	13 %	13 %
7	3x10 ⁻⁶				587	7	90 %			
5	2x10 ⁻⁶	0,25	62 %	67 %	405	4	30 %	8,58	0,3%	0,4 %
5	4x10 ⁻⁴	15,38	u.K.	u.K.	410	5	47 %	0,09	76 %	73 %
4	10 ⁻¹⁰				352	7	30 %			
3	3,5 %	1182,5	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	233	5	92 %	0,98	32 %	36 %
3	10 ⁻¹⁰	680,9	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰						
					247	5	66 %	0,03	86 %	83 %
5	10 ⁻¹⁰				420	7	91 %			
5	10 ⁻¹⁰	0,6	44 %	18 %	284	5	21 %	0,40	53 %	48 %
5	10 ⁻¹⁰	226,15	10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰						
5	10 ⁻¹⁰	294,74	10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	245	5	2,3%	5,23	u.K.	u.K.
6	10 ⁻⁴				605	7	98,3%			
5	30 %	84,9	u.K.	u.K.	408	5	12 %	0,58	41 %	28 %
5	2,2%	0,09	78 %	92 %	454	5	65 %	0,69	40 %	43 %
6	10 ⁻⁴				605	7	98,3%			
5	10 ⁻¹⁰	17,96	u.K.	u.K.	360	5	43 %	0,03	85 %	80 %
5	16 %	0,09	76 %	82 %	424	5	95 %	0,08	77 %	77 %
7	3x10 ⁻⁶				587	7	90 %			
5	13 %	1,70	20 %	26 %	422	5	24 %	0,01	92 %	92 %
5	10 ⁻⁴	2,15	14 %	15 %	394	5	24 %	0,75	38 %	34 %

Lfd. Nr.	Testsubstanz	gly ₁ ⁻						
		ΣM_i	n	homo- genität	$\chi^2_{K/ch}$	χ^2 -Zerl.	χ	ΣM_i
16	Kontrolle	264	5	18 %				560
	Äthylenimin 10 ⁻²	324	5	50 %	6,30	1,2 %	1,4 %	1909
	10 ⁻³	295	5	40 %	1,85	18 %	19 %	1143
	10 ⁻⁴	241	5	54 %	0,96	33 %	30 %	1424
17	Kontrolle	1602	7	5,0%				1109
	Thio- 2 m	907	4	30 %	0,01	92 %	82 %	1424
	harnstoff 2x10 ¹ m	1098	5	20 %	1,20	27 %	28 %	
	2x10 ⁻² m	1024	5	22 %	7,81	u.K.	u.K.	1503
18	Kontrolle	862	7	13 %				1109
	Coffein 10 ⁻¹ m	769	5	4,0%	20,55	5x10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	1029
	10 ⁻² m	632	5	86 %	0,16	70 %	62 %	
	10 ⁻³ m	707	5	48 %	7,14	0,7 %	0,7 %	930
19	Kontrolle	514	6	40 %				1825
	5-Brom- ges.L.	470	5	56 %	2,05	15 %	16 %	1239
	uracil 10 ⁻¹ ges.L.	443	5	2,0 %	0,42	52 %	62 %	
	10 ⁻² ges.L.	434	5	0,9 %	0,10	75 %	84 %	1194
20	Kontrolle	514	6	40 %				1825
	8-Azaguanin ges.L.	455	5	34 %	2,00	16 %	36 %	1260
	10 ⁻¹ ges.L.	411	5	58 %	0,45	50 %	54 %	
	10 ⁻² ges.L.	431	5	98 %	0,009	92 %	93 %	1288
21	Kontrolle	1602	7	5,0 %				1109
	2-Amino- 10 ⁻² m	941	4	73 %	0,34	56 %	50 %	1153
	purin 10 ⁻³ m	1159	5	72 %	0,05	82 %	72 %	
	10 ⁻⁴ m	1203	5	4,5 %	1,75	19 %	19 %	1236
22	Kontrolle	1602	7	5,0 %				1109
	4-Amino- ges.L.	1106	5	38 %	0,79	37 %	38 %	910
	2-thio- 10 ⁻¹ ges.L.	759	4	14 %	18,24	u.K.	u.K.	
	uracil 10 ⁻² ges.L.	913	5	32 %	30,42	u.K.	u.K.	865
23	Kontrolle	514	6	40 %				905
	TEM 1 %	591	5	10 ⁻⁹	36,44	10 ⁻³	5x10 ⁻⁷	513
	0,1 %	520	5	3,0 %	10,44	0,14%	0,25 %	
	0,01%	497	5	11,0%	5,83	1,5 %	2,5 %	2130

arg ₁ ⁻					leu ₁ ⁻					
n	Homo- genität	$\chi^2_{K/ch}$	$P^2_{\chi^2}$ -Zerl.	P χ	ΣM_i	n	Homo- genität	$\chi^2_{K/ch}$	$P^2_{\chi^2}$ -Zerl.	P χ
4	10 ⁻¹⁰				352	7	30 %			
4	10 ⁻⁵	685,14	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	819	5	0,8%	380,9	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰
4	10 ⁻¹⁰	177,78	10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰						
4	10 ⁻¹⁰	388,88	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	250	5	16 %	0,03	86 %	94 %
7	40 %				597	7	93 %			
5	2x10 ⁻⁵	228,7	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	447	5	84 %	0,55	46 %	46 %
5	13 %	285,6	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	490	5	90 %	5,25	2,2%	2,5%
7	40 %				597	7	93 %			
5	3,0%	37,67	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	355	4	37 %	0,40	53 %	57 %
5	9,0 %	13,46	2,5x10 ⁻⁴	3x10 ⁻⁴	332	4	30 %	0,15	70 %	67 %
7	3x10 ⁻⁶				587	7	90 %			
5	11 %	2,44	12 %	16 %	548	5	48 %	20,75	5x10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
5	32 %	6,44	u.K.	u.K.	390	5	82 %	1,24	26 %	27 %
7	3x10 ⁻⁶				587	7	90 %			
5	40 %	1,32	24 %	36 %	430	5	38 %	0,20	66 %	69 %
5	10 ⁻⁵	0,009	92 %	74 %	395	5	70 %	0,81	36 %	38 %
7	40 %				597	7	93 %			
4	0,9%	233,4	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	530	5	40 %	13,69	2x10 ⁻⁴	3x10 ⁻⁴
5	0,35%	120,37	10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	520	5	76 %	11,04	9x10 ⁻⁴	0,12%
7	40 %				597	7	93 %			
4	78 %	65,7	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹⁰	479	5	22 %	4,66	3,0 %	6,5 %
4	46 %	47,29	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹⁰	480	5	65 %	3,81	5,0 %	4,5 %
5	10 ⁻¹⁰				420	7	91 %			
5	10 ⁻¹⁰	114,5	u.K.	u.K.	672	5	90 %	177,39	10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰
5	10 ⁻¹⁰	549,0	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	226	5	7,0%	10,65	u.K.	u.K.

Lfd. Nr.	Testsubstanz	gly ₁						Σ M ₁
		Σ M ₁	n	Homo- genität	χ ² K/ch	P ² -Zerl.	P χ	
24	Kontrolle	514	6	40 %				1109
	N-Lost 10 %	317	5	20 %	17,56	u.K.	u.R.	1047
	1 %	332	5	13 %	12,3	u.K.	u.K.	
	0,1%	432	5	90 %	0,01	92 %	91 %	1083
25	Kontrolle	752	7	10 %				2810
	Bayer, E ₃₉ 0,1%	608	5	6,0%	5,4	2,0%	2,5%	2412
	0,01%							
	0,001 %	618	5	32 %	9,9	0,15%	1,0%	2534
26	Kontrolle	432	5	5,5%				944
	Aeriflavin ges.L.	2114	5	5x10 ⁻¹⁰	1429,0	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	767
	10 ⁻¹ ges.L.	1468	5	10 ⁻⁵	611,4	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	
	10 ⁻² ges.L.							700
27	Kontrolle	783	6	0,35%				1825
	Alizarin-gelb GG ges.L.	792	4	0,20%	72,19	10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	
	10 ⁻¹ ges.L.	615	4	0,35%	10,27	0,13%	0,2 %	1529
	10 ⁻² ges.L.	643	5	35 %	0,86	38 %	40 %	2055
28	Kontrolle	752	7	10 %				2810
	Malachit-grün ges.L.	687	5	32 %	21,45	5x10 ⁻⁶	5x10 ⁻⁶	1852
	10 ⁻¹ ges.L.	796	5	10 ⁻¹⁰	71,98	10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	
	10 ⁻² ges.L.	457	3	2,0%	35,89	10 ⁻⁹	5x10 ⁻⁸	2641
29	Kontrolle	752	7	10 %				2810
	Fuchsin ges.L.	707	4	44 %	91,24	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	2832
	10 ⁻¹ ges.L.	689	5	6,5%	22,45	10 ⁻⁵	4x10 ⁻⁶	
	10 ⁻² ges.L.	696	4	32 %	84,87	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	2613
30	Kontrolle	311	6	70 %				944
	Contergan 1 : 10							983
	1 : 100	455	6	55 %	27,22	10 ⁻⁷	2x10 ⁻⁷	
	1 : 1000	397	6	68 %	10,57	0,1 %	0,12 %	1014
31	Kontrolle	783	6	0,35				2810
	Na-Desoxy-2,5 %	698	5	40 %	1,96	16 %	20 %	2461
	cholal 0,25 %	594	4	62 %	5,63	1,7%	1,8 %	
	0,025%	721	5	4,5%	4,28	4,0%	5,0 %	2395

arg ₁					leu ₁					
n	Homo- genität	$\chi^2_{K/ch}$	$\chi^2_{\text{-Zerl.}}$	χ^P	ΣM_i	n	Homo- genität	$\chi^2_{K/ch}$	$\chi^2_{\text{-Zerl.}}$	χ^P
7	40 %				587	7	90 %			
5	3,5%	43,13	10^{-10}	10^{-10}	439	4	40 %	18,64	$1,5 \times 10^{-5}$	4×10^{-5}
5	0,4%	56,09	10^{-10}	10^{-10}	454	5	22 %	1,80	18,0%	28 %
5	10^{-4}				605	7	98,3%			
5	46 %	1,47	22 %	29 %	421	5	5,0%	0,03	86 %	68 %
5	5×10^{-7}	9,12	0,2%	0,4%	408	5	14 %	0,74	38 %	38 %
5	15 %				352	7	30 %			
5	13 %	0,24	63 %	60 %	1003	5	5×10^{-9}	617,9	$< 10^{-10}$	$< 10^{-10}$
4	4×10^{-4}	5,36	2,0%	3,2%	241	5	69 %	0,31	58 %	61 %
7	3×10^{-6}				605	7	98,3%			
5	10^{-10}	24,26	10^{-6}	6×10^{-6}	454	5	0,2%	1,18	31 %	42 %
5	10^{-10}	211,42	$< 10^{-10}$	$< 10^{-10}$	356	4	66 %	0,23	64 %	66 %
5	10^{-4}				605	7	98,3%			
5	0,4 %	4,39	u.K.	u.K.	354	5	68 %	8,72	u.K.	u.K.
5	3,0 %	19,02	10^{-5}	10^{-5}	436	5	94 %	0,05	82 %	91 %
5	10^{-4}				601	7	10^{-10}			
5	0,8 %	50,57	10^{-10}	10^{-10}	453	5	83 %	0,20	76 %	40 %
5	9,0 %	15,46	8×10^{-5}	6×10^{-5}	418	4	2,0%	6,70	1,0%	0,27%
5	15 %				352	7	30 %			
5	10^{-10}	29,23	10^{-7}	10^{-6}	234	5	26 %	0,65	42 %	40 %
5	10^{-7}	36,23	10^{-9}	10^{-8}	233	5	88 %	0,97	33 %	36 %
5	10^{-4}				605	7	98,3%			
5	0,35 %	3,1	8,0%	7,0%	434	5	66 %	0,01	92 %	94 %
5	5×10^{-7}	0,62	43 %	42 %	401	5	18 %	1,13	26 %	24 %

Lfd. Nr.	Testsubstanz	gly ₁ ⁻						
		ΣM_i	n	Homo- genität	$\chi^2_{K/ch}$	$P^2_{\chi^2-Zerl.}$	P_{χ}	ΣM_i
32	Kontrolle	724	7	30 %				2294
	Aceton 10 ⁻⁰	399	4	38 %	0,34	56 %	56 %	984
	10 ⁻¹	400	4	28 %	0,35	58 %	58 %	
	10 ⁻²	557	5	12 %	1,78	18 %	19 %	1751
33	Aceton-Kontrolle	399	4	38 %				984
	Acridin 1 %	1905	5	10 ⁻⁴	736,5	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	605
	in Aceton 0,1 %	866	5	34 %	85,2	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	
	0,01 %	514	5	30 %	0,2	66 %	66 %	1075
34	Ac-Kontrolle	399	4	38 %				984
	β -Naphthyl ges.L.	465	5	40 %	1,03	31 %	31 %	773
	amin 10 ⁻¹ ges.L.	464	5	12 %	0,98	33 %	30 %	
	Ac. 10 ⁻² ges.L.	488	5	26 %	0,12	72 %	76 %	865
35	Ac-Kontrolle	399	4	38 %				984
	Dibenz- ges.L.	397	4	64 %	0,009	92 %	95 %	811
	anthracen 10 ⁻¹ ges.L.	502	5	84 %	0,009	92 %	92 %	
	Ac. 10 ⁻² ges.L.	408	4	84 %	0,06	80 %	74 %	825
36	Ac-Kontrolle	399	4	38 %				984
	Methyl- ges.L.	466	4	9,0%	5,39	2,0%	2,0%	638
	cholan 10 ⁻¹ ges.L.	526	5	80 %	0,59	42 %	42 %	
	threr / Ac. 10 ⁻² ges.L.	396	4	2,0%	0,07	79 %	92 %	774

arg ₁ ⁻				leu ₁ ⁻					
Homo- genität	χ ² K/ch	P ² -Zerl.	P χ	ΣM _i	n	Homo- genität	χ ² K/ch	P ² -Zerl.	P χ
10 ⁻⁴				601	7	10 ⁻¹⁰			
10 ⁻⁹	179,3	u.K.	u.K.	459	5	26 %	0,01	92 %	30 %
10 ⁻¹⁰	5,45	2,0 %	4,0 %	440	5	6,0 %	0,03	86 %	69 %
10 ⁻⁹				459	5	26 %			
89 %	100,2	u.K.	u.K.	437	5	92 %	0,62	(43%)u.K.	46% (u.K.)
5x10 ⁻⁶	3,16	7,5 %	3,5 %	368	5	64 %	10,3	u.K.	u.K.
10 ⁻⁹				459	5	26 %			
8x10 ⁻⁴	27,96	u.K.	u.K.	283	5	50 %	42,18	u.K.	u.K.
2x10 ⁻⁴	8,75	u.K.	u.K.	337	5	12 %	13,24	u.K.	u.K.
10 ⁻⁹				459	5	26 %			
10 ⁻¹⁰	12,42	u.K.	u.K.	340	4	0,8%	0,89	34 % (u.K.)	28 % (u.K.)
14 %	17,01	u.K.	u.K.	383	5	77 %	7,14	u.K.	u.K.
10 ⁻⁹				459	5	26 %			
18 %	81,76	u.K.	u.K.	352	5	88 %	14,58	u.K.	u.K.
3,0%	28,9	u.K.	u.K.	388	5	32 %	1,5	u.K.	u.K.

Aus Tabelle 11 sind folgende Resultate ersichtlich:

4.3. 1) Signifikanzprüfung im Blättchentest

Die Prüfung auf signifikante Differenz in der M_1 -Zahl zwischen der Plattenserie ohne Chemikal (Spontankontrolle) und der chemikalhaltigen Plattenreihe nach χ^2 -Zerlegung sowie nach χ ohne Rücksicht auf Inhomogenität zeigt sehr ähnliche Ergebnisse. Alle nach χ^2 -Zerlegung signifikanten Fälle konnten auch mit dem χ -Test gesichert werden, und im χ -Test fehlende Signifikanz war auch nach χ^2 -Zerlegung nicht vorhanden.

Eine Entscheidung über die Mutagenität eines Prüfstoffes ist also bei Anwendung des χ -Tests auch bei Vernachlässigung der Inhomogenität in einer Plattenserie möglich.

4.3. 2) Elektive Mutagenität

In den Blättchenversuchen waren die Testsubstanzen H_2O_2 , Hydroxylamin, 8-Azaguanin, Dibenzanthracen, β -Naphthylamin und Methylcholanthren bei keinem der geprüften Stämme in der angewandten Konzentration sicher ($P \leq 1\%$ als Kriterium angenommen) mutagen; bei $HgCl_2$, Na-Desoxycholat und Aceton war nur wahrscheinliche und also höchstens schwache Mutagenität angezeigt ($P = 1$ bis 5%). Andere Substanzen, Fuchsin und TEM, wirkten bei allen 3 Stämmen sicher mutationsauslösend. Die übrigen Stoffe weisen eine mehr oder weniger deutliche Elektivität auf; so waren die Stoffe Acridin, Pikrinsäure, Pyrogallol, Hydrochinon und Essigsäure nur beim Stamm gly, die Stoffe β -Propiolakton und BU nur beim Stamm leu und die Stoffe ATU, DES, Thioharnstoff und Äthylurethan nur beim Stamm arg mutagen (= Stämmelektivität). Deutlich ist auch die Mutagenelektivität der Stämme.

4.3. 3) Mutagene Chemikalkonzentration

Meist war die angewendete höhere Konzentration der Testsubstanz stärker mutagen, als die niedere, jedoch keineswegs immer. Bei NaNO_2 , EMS, Essigsäure und E_{39} ist es sogar umgekehrt. Beim Stamm gly lassen sich mit Pikrinsäure und Coffein zwei Wirkungsoptima vermuten, eins in hoher und eins in weit geringerer Konzentration. Auch kann ein Mutagen bei zwei Stämmen in verschiedenen Konzentrationen wirksam sein; so verhalten sich MnCl_2 , Äthylenimin, Fuchsin, N-Lost bei den Stämmen arg und leu und die Stoffe Alizarin gelb und TEM bei den Stämmen gly und arg. Dieser Befund deutet auf das Vorhandensein von stammspezifisch wirksamen Mutagenkonzentrationen bei Bakterien.

4.3. 4) Koloniezahlverminderung (= u.K.)

Es wurden Testserien gefunden, deren mittlere Mutantenkoloniezahl pro Platte gesichert unter dem Kontrollwert lag (= u.K.). Eine signifikante Koloniezahlverminderung war sowohl nur bei hohen Chemikalkonzentrationen (MnCl_2 , H_2O_2 , Hydrochinon, N-Lost beim Stamm gly; TEM, Acridin, Aceton, H_2O_2 , Hydrochinon, Pyrogallol beim Stamm arg, und Malachitgrün beim Stamm leu), als auch nur bei niederen Konzentrationen (HgCl_2 , N-Methylurethan, BU beim Stamm arg; EMS, TEM, Acridin und Dibenzanthracen beim Stamm leu; Thioharnstoff und ATU beim Stamm gly), wie auch bei allen geprüften Konzentrationen (NaNO_2 , Formaldehyd, β -Naphthylamin, Dibenzanthracen, Methylcholanthren beim Stamm arg; Hydroxylamin, H_2O_2 , Methylcholanthren und β -Naphthylamin beim Stamm leu) festzustellen.

1 % TEM verursachte beim Stamm leu eine Erhöhung der Mutantenkoloniezahl, beim Stamm arg dagegen ihre Herabsetzung. Die 0,01 % TEM-Lösung wirkte umgekehrt: erhöhte die $\bar{M}$ -Zahl beim Stamm arg und verminderte sie beim Stamm leu (Tabelle 12).

T a b e l l e 12

Unterschiedliche Mutationsauslösung durch TEM bei zwei Stämmen.

Stamm	Testsubstanz	$\bar{M} \pm G_{\bar{M}}$	$\chi^2_{K/ch}$	P
arg	Kontrolle	181,0 $\pm$ 6,02		
	TEM 1 %	102,6 $\pm$ 4,53	114,5	u.K.
	0,01 %	426,0 $\pm$ 9,23	549,0	$< 10^{-10}$
leu	Kontrolle	60,0 $\pm$ 2,92		
	TEM 1 %	134,4 $\pm$ 5,18	177,4	10^{-10}
	0,01 %	45,2 $\pm$ 3,00	10,6	u.K.

Als Erklärung der oben beschriebenen Koloniezahlverminderung ist eine Wuchshemmung der Auxotrophen durch das Chemikal anzunehmen; durch diese haben weniger Bakterien die Chance spontan zu mutieren. Löst jedoch das Chemikal bei den wuchsgehemmten Auxotrophen Mutationen aus und werden die Mutanten in ihrem Wuchs nicht gehemmt, so erreicht in manchen Fällen auch die zusätzlich induzierte Mutantenkoloniezahl die Häufigkeit der Spontanmutantenkolonien noch nicht. Erst in Fällen starker Mutagenität wird diese dann überstiegen. Wenn die Mutationen nur in einem engen Konzentrationsbereich ausgelöst werden --(die wirksame Konzentration ist von Stamm zu Stamm verschieden)-- so kann bei höherer Verdünnung des Chemikals die Mutantenkoloniezahl unter den Spontanwert sinken, falls der Wuchs auch dann gehemmt ist (siehe TEM in Tabelle 12).

Es kann beim Blättchentest nicht mit Sicherheit entschieden werden, ob die nicht über den Kontrollwert erhöhten Koloniezahlen auf Testplatten vielleicht doch durch Mutationsauslösung in wuchsgehemmten Populationen entstanden sind. Um dies zu klären waren Methoden anzuwenden, die auch die Anzahl der chemikalbehandelten Bakterien berücksichtigen, z.B. die Papillenmethode (s.u.).

4. 3. 5) Versuche mit wenigwasserlöslichen Substanzen

Die wenigwasserlöslichen Substanzen Acridin, β -Naphthylamin, Dibenzanthracen und Methylcholanthren wurden in reinem Aceton gelöst untersucht und mit einer Aceton-Kontrolle verglichen. Beim Aufträufeln der Testlösung verflüchtigt sich teilweise das Aceton und es bildet sich auf und um das Blättchen ein Niederschlag, wodurch eine genaue Angabe der wirksamen Konzentration unmöglich ist. Das Lösungsmittel sollte weder mutagen noch wuchshemmend sein. Dies wurde durch Vergleich mit einer Salinepufferkontrolle in jedem Versuch geprüft. Beim Stamm arg drückte reines Aceton die Koloniezahl signifikant unter die der Kontrolle, woraus auf eine Wuchshemmung geschlossen wird. In Saline 1:100 verdünntes Aceton (oder eine Verunreinigung in diesem) war beim gleichen Stamm arg wahrscheinlich mutagen ($P = 2\%$). Die weiteren an diesem Stamm mit in Aceton gelösten Substanzen gewonnenen Ergebnisse sind daher nicht eindeutig. Keine Wuchshemmung durch Aceton war beim Stamm gly zu beobachten. Mit Acridin wurde hier Mutagenität gesichert, mit Methylcholanthren als wahrscheinlich gefunden ($P = 2,0\%$). Der Stamm leu zeigte keine Wuchshemmung mit Aceton, alle in Aceton gelösten Substanzen jedoch verminderten die Koloniezahl zum Teil signifikant unter die Aceton-Kontrolle.

Wasserunlösliche Substanzen haben in der Natur eine geringere Chance, in die Zelle hineinzugelangen und eventuell Mutationen auszulösen. Eine hierfür weit größere Wahrscheinlichkeit besteht für die lösliche Form dieser Substanzen, die durch chemische Veränderung der Endgruppen entsteht. Statt der wasserunlöslichen Verbindungen sollten daher wasserlöslich gemachte auf Mutagenität geprüft werden.

5.) Gradientenplatte und Konzentrationsserientest

Wenn im Blättchentest auf Platten ohne signifikante M_1 -Erhöhung eine Anhäufung von Kolonien in einer Diffusionszone gefunden wird, so muß die mutagenitätsverdächtige Chemikalkonzentration genauer festgestellt werden. Einen ersten qualitativ orientierenden Überblick über die Abhängigkeit der mutagenen Wirkung von der Stoffkonzentration gibt die Gradientenplatte nach Szybalski und Bryson (1952).

5. 1. Die Gradientenplatte

Die Gradientenplatte wurde wie folgt hergestellt: 1 ml der Testlösung wurde mit 9 ml verflüssigtem Agar (mit Wachstoffsatz für den Stamm leu) bei 60°C vermischt und bei leichter Schrägstellung der Platte, so daß der Agar an der hochgestellten Plattenseite eben noch den Boden bedeckte, keilförmig erstarren lassen. Darauf wurde in horizontaler Lage der Platte die chemikalfreie Agarschicht (10 ml) gegossen und unmittelbar nach deren Erstarren die Bakteriensuspension, etwa 10^7 Zellen, in Weichagar ausgeplattet und 2 Tage bebrütet. Kontrollplatten enthielten statt der Testlösung Salinepuffer. Der infolge seines Konzentrationsgefälles in die obere Agarschicht diffundierende Teststoff bildet auf der Platte einen etwa linearen Chemikalgradienten. Wie ein spezieller Versuch mit Formaldehyd am Stamm leu zeigte, ist es hierbei gleichgültig, ob die Testsubstanz in die Unterschicht bei chemikalfreier Oberschicht, oder umgekehrt gebracht wird.

Die Diffusion des Chemikals in der Unterschicht der Gradientenplatte verläuft nicht nur nach der Oberschicht hin, sondern auch horizontal nach der chemikalärmeren Seite hin, doch bleibt der Stoffgradient über längere Zeit erhalten. Darauf deuten Gradientenplatten mit Fuchsin, Malachitgrün und Acriflavin, auf denen nach 14 Tagen mit bloßem Auge noch klar der Farbgradient zu erkennen war. Die ausgeplatteten Bakterien sind also während ihres Wachstums der Einwirkung des etwa linearen Gradienten ausgesetzt. Die Auszählung der Gradientenplatten geschah ähnlich wie beim Blättchentest mit Hilfe einer Zonenmarkierung (7 Zonen zu 4x1 cm) senkrecht zum Gradientenverlauf.

5. 2. Der Konzentrationsserientest.

Beim Konzentrationsserientest wurden alle Beurteilungsschwierigkeiten infolge Konzentrationsgefälle und Diffusion vermieden.

Zu 18 ml verflüssigtem Minimalagar (mit Wachstoffsatz 1 γ Leucin pro ml Medium für Versuche mit Stamm leu) wurden 2 ml der Testlösung bei 60°C gemengt und in Platten gegossen. Kontrollplatten enthielten 2 ml Salinepuffer. Das im Medium enthaltene Chemikal wirkte dann auf die etwa 10^7 in der Weichgarschicht aufgetragenen Bakterien in immer derselben Konzentration an. Nach 3 Tagen Bebrütung bei 30°C wurden die gewachsenen Mutantenkolonien ausgezählt.

5. 3. Anwendung der Gradientenplatte und des Konzentrationsserientests.

Die zuerst mit der Gradientenplatte näher festgestellte mutagenitätsverdächtige Chemikalienkonzentration einer Zone auf der Blättchentestplatte (bei fehlender Signifikanz ihres Ganzplattenwertes) wird als Einzelkonzentration, eventuell eine Serie von wenig abweichenden Einzelkonzentrationen, in einer Reihe von Platten auf Mutationsauslösung überprüft. Auf diese Weise läßt sich auch schwache Mutagenität eines Chemicals statistisch sichern.

Am Beispiel Formaldehyd, das sich beim Blättchentest als nur im schmalen Konzentrationsbereich mutagen erwies, wird in Tabelle 13 die Anwendung beider Teste demonstriert.

T a b e l l e 13

Vergleich von 3 gleichzeitig ausgeführten verschiedenen Testen mit Formaldehyd an S.m. leu⁻, 2×10^7 Zellen pro Platte.

BLÄTTCHENTEST - 5 Tage Bebrütung

Chemikal	Gesamt-Kol.Zahl/Pl	davon in Zonen					Mittelwert der
		I	II	III	IV	V	
Spontan-	80	2	2	2	2	1	77,0
Kontrolle	69	2	1	2	1	1	
(Puffer)	82	3	1	3	4	2	
F	10 ⁻²	171	0	17	4	2	168,0
	10 ⁻²	165	0	22	2	2	
	10 ⁻³	87	3	3	4	3	87,0
	10 ⁻³	87	2	2	4	5	

Gesamtplattenkoloniezahl = $\bar{M}$

GRADIENTENTEST - 40 Stunden Bebrütung

Chemikal	Gesamt-Kol.Zahl/Pl	davon in Zonen							$\bar{M}$
		I	II	III	IV	V	VI	VII	
Spontan-	21	3	4	1	2	0	1	0	24,6
Kontrolle	29	1	3	2	1	3	5	4	
(Puffer)	24	2	0	0	3	2	2	2	
F	10 ⁻³	0							
	10 ⁻³	0							
	10 ⁻³	156	0	0	0	12	58	30	166,5
	10 ⁻⁴	177	0	0	0	2	35	50	
	10 ⁻⁵	30	2	2	2	1	1	4	28,0
	10 ⁻⁵	26	2	2	2	0	2	2	

Fortsetzung Tabelle 13

KONZENTRATIONSSERIENTEST - 3 Tage Bebrütung

Chemikal	Kol. /Platte	M
Spontan-	50	
Kontrolle	57	59,5
(Puffer)	66	$\pm 3,85$
	65	
F	10^{-4}	
	0	
	0	
	0	
	645	
	3×10^{-5}	687,0
	692	
	724	
	61	
	10^{-5}	68,0
	74	
	69	$\pm 4,75$
	64	
	3×10^{-6}	68,3
	72	
	69	
	65	
	10^{-6}	60,6
	63	
	54	

Im Konzentrationsserien-
test ist bei der Platten-
reihe mit 10^{-5} Form-
aldehyd kein signifi-
kanter Unterschied der
Mutantenkoloniezahl
nachzuweisen.

$$\begin{aligned}
 F, 10^{-5} &: 68,0 \pm 4,75 \\
 \text{Kontr.} &: 59,5 \pm 3,85 \\
 \Delta &= 8,5 \pm 6,11
 \end{aligned}$$

$$\chi = \frac{8,50}{6,11} = 1,39 ; \quad P = 16 \%$$

Die Blättchenmethode gibt in Tabelle 13 nur sehr grob und unsicher die wirksame Konzentration an; mit der Gradientenplatte ist diese wesentlich genauer und recht genau mit dem Konzentrationsserientest möglich. Alle Teste zeigen Mutagenität an, am besten ist sie bei den Konzentrationsplatten erkennbar (F - Konzentration: 3×10^{-5}).

Eine ähnliche Überprüfung von 4 Fällen mutagenitätsverdächtiger Zonen aus Blättchenplatten brachte dagegen keine positiven Resultate (Tabelle 14). Nur bei Essigsäure, deren Mutagenität schon erwiesen war, konnte auch hier Mutationsauslösung gesichert werden.

Tabelle 14

Konzentrationsserientest als Überprüfung mutagenitätsverdächtiger Zonen im Blättchentest. Für jede Konzentration wurden 4 Platten verwendet, die Signifikanz nach dem χ -Test berechnet.

Stamm	Teststoff	Blättchentest			Konzentrationsserientest		
		aufgetr. Konzentr.	Signif. von M	erhöhte Kolzahl in	Prüfkonzentr.	$\bar{M} \pm \bar{G}$	P nach
leu	N-Methylurethan	10^{-3}	P=73 %	Zone I	Kontr. 10^{-3} 3×10^{-4} 10^{-4}	87,33 $\pm$ 3,81 91,75 $\pm$ 4,78 82,0 $\pm$ 4,52 88,25 $\pm$ 4,69	48 % 36 % 83 %
leu	Hydrochinon	$10^{-3}m$	43 %	Zone IV	Kontr. $10^{-4}m$ $3 \times 10^{-5}m$ $10^{-5}m$ $3 \times 10^{-6}m$ $10^{-6}m$	87,33 $\pm$ 3,81 70,75 $\pm$ 4,26 87,75 $\pm$ 4,59 92,25 $\pm$ 4,80 92,50 $\pm$ 4,81 89,0 $\pm$ 4,71	u.K. 94 % 42 % 40 % 79 %
gly	β -Propiolakton	10^{-3}	82 %	Zone I	Kontr. 10^{-3} 3×10^{-4} 10^{-4}	172,6 $\pm$ 6,04 179,0 $\pm$ 6,68 173,25 $\pm$ 6,57 179,66 $\pm$ 7,72	48 % 94 % 48 %
gly	Essigsäure	10^{-4}	10^{-5}	in den Zonen IIu.III	Kontr. 10^{-5} 3×10^{-6} 10^{-6}	172,6 $\pm$ 6,04 190,75 $\pm$ 6,90 193,25 $\pm$ 6,95 198,25 $\pm$ 7,05	4,8 % 2,5 % 0,6 %

Die in Tabelle 14 angegebenen Versuche wurden mit dem Konzentrationsserientest allein und wegen der Chemikalverdünnung auf Blättchenplatten, in gegenüber diesen herabgesetzten Konzentrationen geprüft. Für eine genauere Erfassung der verdächtigen Konzentration ist die Anwendung der Gradientenplatte notwendig.

Die Ergebnisse der Tabelle besagen, dass bei Erhöhung der Koloniezahl in einer Diffusionszone der Blättchenplatte, auf entsprechenden Konzentrationsplatten noch keine Mutagenität nachweisbar ist; sie ist erst dann nachweisbar, wenn die Zonen-Koloniezahl sehr stark erhöht ist, oder wenn mehrere Zonen erhöhte Koloniezahlen enthalten. In diesem Falle zeigt jedoch auch die Ganzplattenauswertung einen signifikanten Unterschied, so daß die Auswertung der mutagenitätsverdächtigen Zonen auf Blättchenplatten für einen Mutagenitätsnachweis wegfallen kann.

5. 4. Auftreten unterschiedlicher Kolonietypen

Die in Tabelle 13 beschriebenen formaldehydhaltigen Blättchen- und Gradientenplatten wiesen nächst der Hemmzone Kolonien verschiedener Größe auf. Ein Ausstrich dieser sowie von auf Kontrollplatten gewachsenen Kolonien auf Minimalagarplatten und gleichzeitig auf eine Formaldehydgradientenplatte mit der Maximalkonzentration 10^{-4} zeigte nach 24-stündiger Bebrütung keine merklichen Unterschiede in der Giftresistenz zwischen den Isolaten. Auf Minimalagar dagegen zeigte der Ausstrich von großen Kolonien aus den Formaldehyd-Platten und Kontrollplatten nach 40 Stunden gutes Wachstum, was auf Prototrophie schließen läßt. Ausgestrichene mittelgrosse Kolonien, die nur auf F-Platten gefunden wurden, wuchsen dagegen schwach, blieben klein und wiesen nach 7 Tagen Bebrütung Papillen auf, was bedeutet, dass sie nicht prototroph, aber auch nicht vollauxotroph, sondern wohl (stark) leaky sind und in ihnen schnellerwüchsige Mutanten entstehen. Die ausgestrichenen Mikro-kolonien waren auf Minimalagar garnicht oder sehr schwach nach 7 Tagen Bebrütung gewachsen.

Die unterschiedlichen Koloniegrößentypen können als durch das Formaldehyd zum Teil induzierte Vollprototrophiemutationen und zum Teil als Mutationen zum leaky, also schwachauxotrophen Zustand betrachtet werden.

Im Versuch (146) mit Acriflavin an demselben Stamm leu waren auf der Gradientenplatte und im Konzentrationsserientest im höheren Konzentrationsbereich neben den in der Zahl von der Kontrolle kaum abweichenden großen Mutantenkolonien auffallend viele kleine Kolonien zu finden. Platten mit Äthylenimin hatten in dem gleichen Versuch die Anzahl sowohl der großen prototrophen als auch die der kleineren (unterschiedlich) stark erhöht. Überprüfung der kleinen Kolonien auf Prototrophie brachte in beiden Fällen das gleiche Ergebnis wie oben, schwacher Wuchs mit Papillenbildung.

Auch auf Diäthylsulfat-Platten, die mit dem Stamm arg (der als schwach leaky gilt) beimpft waren, wuchsen, wenn auch nicht so häufig, wie bei leu, unterschiedliche Kolonietypen. Auf Minimalagar ausgestrichen, zeigten die kleinen Kolonien meist auch schwachen Wuchs mit Papillenbildung.

Auf Platten mit Stamm gly waren keine ähnlichen verschiedenen Kolonietypen zu beobachten.

Crick und Mitarbeiter (1961) fanden bei Versuchen mit dem Acridinfarbstoff Proflavin am T₄-Phagen keine echten Rückmutationen, sondern einen "Pseudo-Wildtyp", der durch eine Suppressor-Mutation verursacht war. Suppressormutationen geschehen - anders wie echte Rückmutationen - nicht am Ort der Basenänderung durch Hinmutation, sondern an anderer Stelle. Das mutierte Genom wird dadurch nicht in den ursprünglichen Zustand versetzt, aber das betroffene Gen nimmt seine Funktion teilweise, manchmal sogar vollständig wieder auf (Freese 1963). Eine teilweise Wiederherstellung der Genfunktion wird meist an geringerem Wachstum gegenüber den echten Rückmutanten erkannt.

Inwiefern eine Suppressormutation für den leaky Zustand bei unseren Bakterien verantwortlich ist, könnte durch Kreuzungsexperimente entschieden werden. Die oben beschriebenen Befunde lassen die Auslösung von nichtvollprototrophen Suppressormutanten durch Formaldehyd, Acriflavin, Äthylenimin

und vielleicht auch Diäthylsulfat vermuten. Das unterschiedlich häufige Auftreten von leaky Mutanten gegenüber den Prototrophiemutanten nach Acriflavin- und nach Äthylenimineinwirkung auf den Stamm leu macht eine elektive Induktion von Suppressor-Mutanten durch Acriflavin wahrscheinlich.

Für den Mutagenitätsnachweis ist es gleichgültig, welcher Art Rückmutation ausgelöst wird. Weil die langsamer wachsenden Rückmutanten etwas später ausgewachsene Kolonien bilden, erscheint eine Auszählung der Testplatten erst nach 4 Tagen Bebrütung sinngerecht.

6.) Die Papillenmethode

6. 1. Bestimmung der Mutationsrate nach der Papillenmethode.

Bei den in den bisherigen Abschnitten studierten Methoden wurde eine große Zahl auxotropher Zellen in einer Weichagarschicht während ihres geringen Wachstums dem Chemikal ausgesetzt und die Mutationen zur Prototrophie als große Kolonien gezählt. Dadurch konnte zwar Mutagenität eindeutig festgestellt und auch quantitativ durch die Zahl der Mutantenkolonien erfasst werden. Jedoch konnte die Mutationsrate als Häufigkeit von Mutationen pro Zelle und Zellteilung aus diesen Werten nicht gewonnen werden. Vor allem aber konnte in Fällen von Hemmung des Wuchses des Eltertyps durch das Chemikal nicht entschieden werden, ob nicht trotz einer geringeren Zahl Mutantenkolonien als in der Kontrolle Mutagenität vorliegt oder nicht.

Eine Ausschaltung dieser Art von Selektion ist jedoch mit der Papillenmethode möglich. Sie zählt zwar auch Mutationsergebnisse, und zwar als auf einer auxotrophen Elterkolonie als Papillen manifestierten Prototrophiemutation, erlaubt aber diese Zahl auf die Zellzahl in der Kolonie, in der die Mutationen geschahen, zu beziehen und so die Mutationsrate zu gewinnen. Bei selektiver Wuchshemmung der Auxotrophen durch Giftstoffe wird zwar auch die Zahl der Mutationsergebnisse geringer, die Mutationshäufigkeit pro Bakterium bleibt aber davon unberührt. Eine selektive Hemmung der zur Besserwüchsigkeit (Prototrophie) mutierten Zellen wäre am Fehlen jeglicher Papillen zu erkennen.

Die Papillenmethode mißt die Mutationsrate α , das ist die Wahrscheinlichkeit eines bestimmten Mutationsergebnisses pro Bakterium und pro Zellgeneration. Es gilt die Formel

$$\alpha = \frac{k \cdot \ln 2}{N} ;$$

dabei bedeutet

k = mittlere Anzahl der Mutantenklone und also
Mutationsereignisse (= Papillen) pro Kolonie.

N = durchschnittliche Zellzahl in der Kolonie.

Der Faktor $\ln 2 = 0,69$ berücksichtigt das Wachsen der N Zellen durch Zweiteilung aus einer oder wenigen Zellen.

Die mittlere Papillenhäufigkeit pro Kolonie k wird nach Auszählung der Kolonien unter den Präpariermikroskop berechnet, wobei Kolonien mit n = 0, 1, 2, 3 ... Papillen getrennt registriert werden.

$$k = \frac{\sum_{n=0}^{\infty} n \cdot Q_n}{\sum_{n=0}^{\infty} Q_n} = \frac{\text{Gesamtzahl d. Papillen}}{\text{Gesamtzahl d. Kolonien}} ;$$

Q_n = Anzahl der Kolonien mit jeweils n Papillen
 n = Anzahl der Papillen/Kolonie

Als Zellzahl N wurde die mittlere Zellzahl von etwa 10 durchschnittlich großen, papillenfreien Kolonien verwendet.

Es wurde untersucht, wie eine Erhöhung der Mutationsrate nach Einwirkung des dem Agar zugesetzten Mutagens auf die suboptimal wachsenden Bakterien am besten nachzuweisen ist. Als Objekte dienten wiederum die Stämme gly, arg und leu.

6. 2. Die günstige Wuchsstoffmenge für die Mutationsratenbestimmung

Die Papillenausbildung hängt von der Intensität des Elternwachstum relativ zum Wuchs der Mutanten, also von der im Medium vorhandenen Wuchsstoffmenge ab. Bei zu geringer Wuchsstoffmenge bleiben die Kolonien zu klein, so daß keine oder sehr wenige Papillen gebildet werden. Die Zellzahl pro Kolo-

nie soll ja in der Nähe der kritischen Populationsgrösse (Kaplan 1957; 1958) $N_k = \frac{\ln 2}{\alpha}$ liegen, bei der im Mittel 1 Mutation (der Rate α) pro Kolonie geschieht, also 1 Papille entsteht. Ist der Wuchsstoffzusatz zu hoch, so teilen sich die Auxotrophen nahezu so schnell wie die prototrophen Mutanten und eine Papillenbildung tritt nicht oder nur unsicher erkennbar ein.

Zunächst wurde die für die Bestimmung der spontanen Mutationsraten der drei Stämme günstige Wuchsstoffmenge ausgewählt (Tabelle 15).

T a b e l l e 15

Abhängigkeit der Mutationsratenausbeute von der zugesetzten Wuchsstoffmenge.

Stamm	zugesetzter Wuchsstoff	Zusatzmenge γ /ml Mi-Agar	k	N	α
arg	Arginin	80	0		
		50	0,06		
		10	0,17		
		3	0,17	$7,0 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^{-9}$
		2	0,24	3,6	4,6
		1	0,24	3,3	5,0
		0,5	0,14	2,0	4,8
leu	Leucin	30	0,26	$3,5 \cdot 10^8$	$0,51 \cdot 10^{-9}$
		20	0,58	4,6	0,87
		10	0,59	3,0	1,3
		5	0,37	1,4	1,8
gly	Glycin	50	0,92	$7,2 \cdot 10^7$	$0,88 \cdot 10^{-8}$
		40	0,96	4,9	1,35
		30	0,87	4,8	1,25
		20	0,76	4,1	1,28

Die mittleren Papillenhäufigkeiten pro Kolonie k steigen nach Tabelle 15 bei abfallendem Wuchsstoffzusatz wegen des zunehmend besseren Wachses der Mutanten gegenüber den Auxotrophen und damit der Ausprägung der Mutationen als erkennbare Papillen zuerst an und erreichen ein Maximum. Sie fallen dann wieder ab, weil die Zellzahl pro Kolonie N und damit die Zahl der Mutationsereignisse in ihr geringer wird. Die höchste erhaltene Mutationsrate liegt für den Stamm arg bei $1 \times$ Arginin pro ml Medium, für den Stamm leu bei $5 \times$ Leucin und für den Stamm gly bei $40 - 20 \times$ Glycin pro ml Agar. Diese Höchstwerte von α zeigen die Wuchsstoffkonzentrationen an, bei denen die Unterdrückung der Papillen am geringsten ist. Die Papillenzahlen k infolge spontaner Mutabilität sind bei leu und arg erheblich kleiner als 1, so daß bei Mutagenität eines dem Agar zugesetzten Stoffes ihre Zahl noch wesentlich zunehmen kann, ohne dass die Messgenauigkeit darunter leidet. Bei hoher Mutagenität von Prüfstoffen fließen nämlich die allzu häufigen Papillen zusammen und sind dann schwer oder nicht einzeln zählbar. Da beim Stamm gly das spontane k bei $40 \times$ /ml nahe 1 liegt, wurde für die Versuche $20 \times$ /ml gewählt, was nur 0,76 Papillen/Kolonie ergibt, so daß auch hier ein ausreichender Spielraum nach oben verfügbar ist.

6. 3. Bestimmung der Zellzahl in papillenfremen Kolonien.

Für die Bestimmung des mittleren Zellgehaltes $\bar{N}$ der papillenfremen Kolonien wurde die Zählkammerauswertung angewandt, die die Anzahl der während des Wachstums einer Chemikaleinwirkung ausgesetzt gewesenen Zellen einschliesslich der toten angibt. Papillenfremde, durchschnittlich große Kolonien wurden samt der darunterliegenden Agarschicht ausgestochen, in Saline suspendiert, die Suspension in der Zählkammer gezählt und $\bar{N}$ berechnet. Es ist gleichgültig, ob die Streuung des Mittelwertes $\bar{N}$ aus einer Reihe von Einzelkolonien oder

aus einer Sammelsuspension der ausgestochenen Kolonien berechnet wird. Diesbezügliche Prüfungen (Tabelle 16) ergaben keine unterschiedlichen Mittelwerte und auch keine wesentlich verschiedenen Streuungen von N.

Tabelle 16

Berechnung des Titors und der Streuung aus Einzelkolonien sowie aus der Sammelsuspension bei gleichem Koloniedurchmesser.

Ser.marc., gly

Koloniedurchmesser = 1,6 mm

10 Einzelkolonien: Sammelsuspension aus
10 Kolonien:

2,10 · 10⁸
1,50
1,78
1,65
1,80
2,03
1,80
1,65
1,83
2,00

$N \pm s_N = 2,04$

$\pm 0,23 \cdot 10^8$

$\Sigma = 18,23$

$2,04 \pm 0,23$

$1,82 \pm 0,22$

$\Delta = 0,22 \pm 0,32$

$\chi = 0,68; P = 50 \%$

$N \pm s_N = 1,82 \pm 0,22 \cdot 10^8$

Ser.marc., leu

Koloniedurchmesser = 1,8 mm

6 Einzelkolonien: Sammelsuspension aus
6 Kolonien:

2,47 · 10⁸
1,81
1,77
1,82
1,35
2,08

$N \pm s_N = 2,32$

$\pm 0,12 \cdot 10^8$

11,30 : 6

= 1,88

$2,32 \pm 0,12$

$1,88 \pm 0,50$

$0,44 \pm 0,51$

$\chi = 0,86$

$N \pm s_N = 1,88 \pm 0,50 \cdot 10^8$

$P = 38\%$

In weiteren Versuchen wurden daher die einfacher durchzuführenden Sammelsuspensionen verwendet.

Eine Vereinfachung der Bestimmung von N wäre die Messung des Koloniedurchmessers und die Benutzung einer Eichkurve aus Zellzahlen von Kolonien verschiedener Größe. Gemäß der Annahme, dass die Zellzahl einer Kolonie etwa proportional zu ihrer Fläche ist (Ryan 1952), sollte dann gelten: $N \sim d^2$ und $\lg N \sim 2 \lg d$.

Es wurde geprüft, ob diese Beziehung auch **beim** Stamm gly zutrifft. Die ermittelten Zell- und Keimzahlen in papillenfreien Kolonien verschiedenen Durchmessers des Stammes gly sind in Tabelle 17 wiedergegeben. Der mit Hilfe eines Okularmikrometers gemessene Durchmesser d der Kolonien entspricht: $10 \text{ (Strich)} = 1 \text{ mm}$; $(1 = 0,1 \text{ mm})$.

T a b e l l e 17

Zell- und Keimzahlen in Kolonien verschiedener Grösse.
S.mar., gly, auf Minimalagar + 30 γ /ml Glycin.

Art der N-Bestimmung	d	N	lg d	lg N	Zahl der ausgest. Kol.
Zählkammer- auswertung	11	$8,6 \cdot 10^7$	1,04 139	7,93 450	3
	12	$1,1 \cdot 10^8$	1,07 918	8,04 139	4
	13	1,3	1,11 394	8,11 394	5
	14	1,6	1,14 613	8,20 412	4
	15	2,1	1,17 609	8,32 222	2
Keimzahlbe- stimmung auf Komplett- agar	11	$3,4 \cdot 10^7$	1,04 139	7,53 148	
	12	4,7	1,07 918	7,67 210	
	13	5,9	1,11 394	7,77 085	
	14	7,6	1,14 613	7,88 081	
	15	6,2	1,17 609	7,79 239	

Zell- und Keimzahl wurden jeweils aus der gleichen Suspension bestimmt.

Die gefundene Abhängigkeit des $\lg N$ von $\lg d$ in gly-Kolonien zeigt Fig. 3.

Sie folgt etwa $\lg N \sim 3 \lg d$, zeigt also nicht Flächenproportionalität, sondern Volumenproportionalität der Zellzahl.

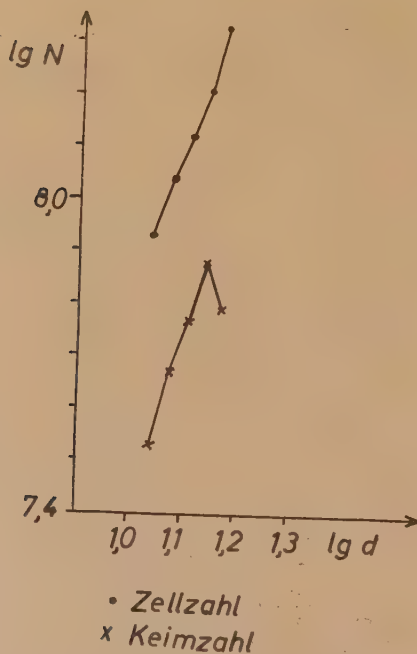


Fig. 3 Abhängigkeit der Keim- und Zellzahl vom Koloniedurchmesser. (gezeichnet nach den Daten in Tabelle 17).

Auf chemikalhaltigem Boden gewachsene Kolonien vom gleichen Durchmesser wie die unbehandelten hatten jedoch keineswegs immer die gleiche Zellzahl, sondern meist geringere (Tabelle 18).

T a b e l l e 18

Titer gleichgroßer Kolonien von unbehandelten und chemikalhaltigen Platten. Ser.marc. arg, Zählkammerauswertung.

Tests substanz in Agar Mengen pro ml	Kol-Ø in 0,1 mm	ausgewertete Kol.-Zahl	$N \cdot 10^7 \pm 6$
Kontrolle	12	4	$8,12 \pm 0,50$
TEM 10γ	12	4	$7,40 \pm 0,48$
1γ	12	4	$6,84 \pm 0,46$
Aza- 10 ⁻¹ ges.L.	12	4	$4,62 \pm 0,38$
guanin 10 ⁻² ges.L.	12	5	$5,45 \pm 0,37$
E ₃₉ 100 γ	12	4	$6,18 \pm 0,44$

Aus Befunden in den Tabellen 17 und 18 wird gefolgert:

1) die Verwendung einer Eichkurve erscheint bei chemikalbehandelten Kolonien nicht möglich, da jedes Chemikal die Zellzahl N bei der Kontrolle ähnlichem Koloniedurchmesser unterschiedlich (stark) vermindert. In späteren Versuchen waren die chemikalbehandelten Kolonien im Vergleich zur Kontrolle meist kleiner im Durchmesser und sehr unterschiedlich in der Zellzahl. Die Bestimmung von N muß daher für jedes Chemikal gesondert durchgeführt werden.

2) eine Eichkurve wäre nur bei unbehandelten Kolonien anwendbar, doch wäre dann für jeden Stamm eine eigene Eichkurve

notwendig, da der gleiche Koloniedurchmesser verschiedener Stämme nicht die gleiche Zellzahl enthält (z.B. arg und gly bei $d = 12$ in Tabelle 17 und 18). Wegen der zu geringen Anwendungsmöglichkeit wurde auf den Gebrauch von Eichkurven bei Kontrollen verzichtet.

6. 4. Die statistische Auswertung von Papillenversuchen

Der Papillenversuch mit Chemikalien wurde wie folgt durchgeführt: in 18 ml verflüssigten Minimalagar wurde bei 60°C 2 ml der Testlösung und die für die Mutanten nötige Wachstoffs menge zugesetzt und auf Platten gegossen. Kontrollplatten enthielten 2 ml des Lösungsmittels Salinepuffer. Nach 24-stündiger Vortrocknung in der Brutkammer wurden etwa 100 Zellen einer Suspension von über Nacht auf Komplettagar gewachsenen Kolonien pro Platte ausgespatelt. Nach 4 Tagen Inkubation bei 30°C erfolgte die Auswertung der Versuche.

Der Beweis einer Mutagenität ist erbracht, wenn die aus einer Testreihe errechnete Mutationsrate über die spontane Mutationsrate gesichert erhöht ist. Die bei der Signifikanzprüfung verwendeten statistischen Methoden waren:

1.) der χ -Test. Er mißt den Unterschied zwischen den Mutationsraten der spontanen und chemikalhaltigen Plattenreihe nach der Formel:

$$\chi = \frac{\alpha_{sp} - \alpha_{ch}}{G_{\Delta}} ; \quad \alpha_{sp} = \text{Mutationsrate der Spontankontrolle}$$

$$G_{\Delta} = \sqrt{G_{\alpha_{sp}}^2 + G_{\alpha_{ch}}^2} ; \quad \alpha_{ch} = \text{Mutationsrate auf Chemikalplatten}$$

Die Streuung der Mutationsrate G_{α} setzt sich zusammen aus den nach der Poissonstreuung berechneten Fehlerschwankungen von $\bar{k}$ und N . Für G_{α} kann nach dem Gauß'schen Fehlerfort-

pflanzungsgesetz eine Näherung errechnet werden:

$$\alpha \pm G_{\alpha} = \frac{(\bar{k} \pm G_{\bar{k}}) \cdot \ln 2}{N \pm G_N} = \frac{\bar{k} \cdot \ln 2}{N} \pm \frac{G_{\bar{k}} \cdot \ln 2}{N} \sqrt{\left(\frac{G_{\bar{k}}}{\bar{k}}\right)^2 + \left(\frac{G_N}{N}\right)^2};$$

Der nach der Poissonstreuung berechnete Fehler von $\bar{k}$ ist jedoch nur dann richtig, wenn zwischen den Platten einer Plattenreihe Homogenität der Papillenverteilung vorliegt, andernfalls ist eine andere statistische Methode anzuwenden.

2.) Homogenitätsprüfung der Papillenverteilung

Nicht immer war innerhalb einer Plattenreihe die Papillenverteilung homogen. Die Prüfung auf Homogenität wurde an jeder Plattenreihe mit Hilfe des χ^2 -Tests vorgenommen.

$$\chi_m^2 = \sum_{i=0}^v \frac{(a_i - np_i)^2}{np_i};$$

a_i = gefundene Koloniezahl mit i Papillen

np_i = Erwartungswert für Kol.-Zahl mit i Papillen

$i = 0, 1, 2, 3 \dots$ = Anzahl der Papillen/Kolonie

n = Anzahl der Kolonien

p_i = Grundhäufigkeit der Kol. mit i Papillen in der Gesamtstichprobe

$m = (v - 1) (j - 1)$ = Zahl der Freiheitsgrade

v = Zahl der Kolonieklassen

j = Zahl der Platten

Gemessen wird hierbei die gefundene Gesamtabweichung der Kolonien mit i Papillen von den zu erwartenden Koloniezahlen mit i Papillen np_i . Der Erwartungswert np_i läßt sich aus der Grundhäufigkeit der Kolonien mit i Papillen in der geprüften Plattenreihe

$$p_i = \frac{\sum a_i}{\sum n} \quad \text{und der Kolonie-}$$

zahl n auf der Platte berechnen. Die Zufallswahrscheinlichkeit P für das gewonnene χ^2 bei m Freiheitsgraden wurde den statistischen Tafeln von Pöta entnommen.

Tabelle 19 veranschaulicht eine Homogenitätsprüfung der Papillenverteilung auf Testplatten mit BU und Azaguanin. Bei der Berechnung von χ^2 wurden die Klassen mit geringeren Koloniezahlen in einer Klasse zusammengefasst, damit der Erwartungswert np_1 größer als 5 wird, sonst würden die Werte ungenau. Ist der Erwartungswert ≤ 5 , muß vom Absolutwert der Differenz zwischen Erwartungswert und beobachtetem Wert 0,5 abgezogen werden (= korrigierter χ^2 -Test von Yates), (Weber 1961).

Die Berechnung des Fehlers der Mutationsrate σ_α nach der obigen Näherungsformel ist recht umständlich und bringt leicht weitere Ungenauigkeit ins Ergebnis. Die Inhomogenität der Papillenverteilung führt bei dieser Berechnung ebenfalls zu ungenauen Ergebnissen. Die Signifikanzprüfung ist daher noch mit einer anderen statistischen Methode versucht worden.

Tabelle 19

Prüfung auf Homogenität der Papillenverteilung auf
Platten einer Testreihe. ($\Delta = a_i - np_i$) .

5-Bromuracil, 25 γ /ml Medium										
Kol. mit i Papillen										
Platte	1	2	3	4	5	0	Σ Kol. $= n$	Δ	Δ^2	Δ^2/np_i
1	$a_i = 44$	28	4	-	-	2	78	2,4	5,76	0,138
	$np_i = 41,6$	25,05	6-11,4					2,95	8,70	0,347
2	48	31	11	4	-	3	97	-5,4	29,16	2,560
	51,7	31,15	18-14,3					-3,7	13,69	0,264
3	67	28	10	3	1	2	111	-0,15	0,022	0,0007
	59,2	35,6	16-16,2					3,7	13,69	0,957
4	42	34	10	3	-	2	91	7,8	60,84	1,027
	48,5	29,2	15-13,3					-7,6	57,76	1,622
Σa_i	201	121	35	10	1	9	377	-0,2	0,04	0,002
			55					-6,5	42,25	0,873
								4,8	23,04	0,790
								1,7	2,89	0,217
										8,7977
	p_1	p_2	$p_{3,4,5,0}$							
	0,533	+ 0,321	+ 0,146			= 1,000				

$$p_1 = 0,533 + p_2 = 0,321 + p_3 = 4,5,0 = 1,000$$

$$p_i = \frac{\Sigma a_i}{\Sigma n} \quad \chi^2_{(3-1)(4-1)=6} = 8,80; \quad P = 18 \%;$$

Azaguanin, 10 γ /ml Medium								
Kol. mit i Papillen					Yates'- Korrektur			
Platte	0	1	2	Σ Kol. $= n$	Δ	(-0,5)	Δ^2	Δ^2/np_i
1	$a_i = 54$	30	2	86	-0,7		0,49	0,009
	$np_i = 54,7$	29,22	2,15		0,78		0,608	0,021
2	42	34	5	81	-0,15	0,35	0,122	0,056
	51,5	27,6	2,02		-9,5		90,25	1,750
3	58	34	2	94	6,4		40,96	1,483
	59,8	32,0	2,35		2,98	2,48	6,15	3,042
4	71	37	-	108	1,8		3,24	0,054
	68,7	36,7	2,7		2,0		4,0	0,125
5	79	37	3	119	-0,35	0,15	0,012	0,005
	75,7	40,5	2,98		2,3		5,29	0,077
6	102	45	4	151	0,3		0,09	0,002
	96,1	51,4	3,8		-2,7	-2,2	4,84	1,792
	406	217	16	639	3,3		10,89	0,144
					-3,5		12,25	0,302
					0,02	-0,48	0,24	0,080
					5,9		34,81	0,360
					-6,4		40,96	0,795
					0,2	-0,3	0,09	0,024
								10,121

$$P_0 \quad P_1 \quad P_2$$

$$0,636 + 0,340 + 0,025 = 1,001$$

$$\chi^2_{(3-1)(6-1)=10} = 10,12; \quad P = 42\%$$

$$p_0 = 0,636 + p_1 = 0,340 + p_2 = 0,025 = 1,001$$

$$\chi^2_{(3-1)(6-1)=10} = 10,12; \quad P = 42 \%;$$

3.) der t - Test. Er gilt für kleine Stichproben und bei kontinuierlicher Variabilität. Als solche wurde die für jede Platte gesondert berechnete Mutationsrate α behandelt, die Anzahl der Platten einer Plattenreihe stellt die Stichproben- größe dar. Der Fehler $s_{\bar{\alpha}}$ des Mittelwertes $\bar{\alpha}$ aus allen Platten wurde nach der mittleren quadratischen Abweichung be- rechnet.

$$t_m = \frac{\bar{\alpha}_{sp} - \bar{\alpha}_{ch}}{s_{\Delta}}; \quad s_{\Delta} = t \sqrt{s^2_{\bar{\alpha}_{sp}} + s^2_{\bar{\alpha}_{ch}}}; \quad s_{\bar{\alpha}} = \sqrt{\frac{\sum (\alpha_i - \bar{\alpha})^2}{n(n-1)}};$$

$m = n_{sp} + n_{ch} - 2 =$ Zahl der Freiheitsgrade

$n =$ Zahl der Platten einer Reihe .

In Tabelle 20 ist das Beispiel einer Signifikanzprüfung nach dem t - Test gebracht.

T a b e l l e 20

Signifikanzprüfung einer im Papillenversuch mit H_2O_2 behandelten Stichprobe nach dem t - Test. Ser.märz., gly

Teststoff	Platte Nr.	Ø d.Kol. (in 0,1 mm)	N ⁸ · 10 ⁸ /Kol.	Papill. pro Pl.	Kol/ Pl.	k	α · 10 ⁻⁹	$\bar{\alpha} \pm s_{\bar{\alpha}}$
Spontan- Kontrolle	1	15,14	1,16	64	90	0,712	4,24	5,02 $\pm 0,468 \cdot 10^{-9}$
	2	14,14	1,10	84	127	0,661	4,15	
	3	15,14	1,26	75	94	0,800	4,38	
	4	14,14	1,00	83	130	0,639	4,41	
	5	14,14	1,10	117	159	0,735	4,61	
	6	15,15	0,92	113	116	0,975	7,32	
	7	15,14	0,98	95	110	0,864	6,08	
H_2O_2 10 ⁻⁶	1	13,13	0,94	101	108	0,935	6,85	5,73 $\pm 0,167 \cdot 10^{-9}$
	2	12,12	1,24	100	138	0,725	4,04	
	3	12,12	0,90	153	180	0,850	6,52	
	4	12,12	1,01	121	168	0,720	4,93	
	5	13,11	0,82	83	111	0,748	6,30	

Aus jeder Platte wurden 2 Kolonien durchschnittlicher Grösse für die Bestimmung von N ausgestochen.

$$\begin{aligned}\bar{\alpha}_{\text{H}_2\text{O}_2} &: 5,73 \pm 0,167 & t_{10} &= \frac{0,71}{0,495} = 1,43 ; P = 18 \% \\ \bar{\alpha}_{\text{sp}} &: \underline{5,02 \pm 0,468} \\ \Delta &= 0,71 \pm 0,495\end{aligned}$$

Die etwas höhere Mutationsrate in der H_2O_2 - Plattenserie ist also nicht signifikant von der spontanen verschieden.

6. 5. Ergebnisse der Papillenversuche

6. 5. 1) Übersicht der Ergebnisse

Die Ergebnisse der mit der Papillenmethode ausgeführten Mutagenitätsversuche sind in Tabelle 21 wiedergegeben. Untersucht wurde die Mutationsauslösung von solchen Substanzen, bei denen im Blättchentest keine Mutagenität sicher nachzuweisen war und für deren Nachweis am gleichen Stamm vielleicht andere Versuchsmethoden notwendig wären. Ausserdem sind einige im Blättchentest positive Ergebnisse mit der Papillenmethode überprüft worden. Die Angaben über eine Plattenreihe enthalten die Anzahl der geprüften Platten, die Gesamtkoloniezahl und die Homogenität der Papillenverteilung auf ihnen. Die Signifikanz der Erhöhung von Mutationsraten ist nach dem t-Test berechnet, bei inhomogener Papillenverteilung und in einigen Fällen bei gesichertem Unterschied wurde zum Vergleich der Ergebnisse auch der χ -Test verwendet. Die geprüften Chemikalienkonzentrationen wurden aufgrund von Literaturangaben wie auch nach dem Blättchentest gewählt.

In den Signifikanzberechnungen von Ergebnissen mit H_2O_2 , Thioharnstoff, β -Propiolakton und Essigsäure wurden die Werte zu kleiner Plattenreihen (2 Platten) verschiedener Konzentrationen des gleichen Chemikals zusammengefasst, um dadurch sichere Ergebnisse zu erhalten. Dies ist jedoch nur deshalb statthaft, weil eine zufallsgemässe Verteilung der Papillen und der Zellzahl in den Kolonien auf alle Platten vorliegt.

Die Ergebnisse in Tabelle 21 zeigen nur grobe Übereinstimmung in der nach verschiedenen Methoden berechneten Signifikanz. Der t-Test ist, zumindest bei Platteninhomogenität, wegen der besseren Fehlerberechnung einwandfreier als der χ^2 -Test, allerdings aber insensibler gegen Differenzen der Mutationsraten.

Erklärung zur Tabelle 21 S.69/70

Σ Kol.	=	Gesamtkoloniezahl der Plattenreihe
n	=	Anzahl der geprüften Platten
$\bar{k}$	=	mittlere Papillenhäufigkeit pro Kolonie
$\bar{N}$	=	mittlere Zellzahl in papillenfreien Kolonien
$\bar{\alpha}$	=	mittlere Mutationsrate, aus den Mutationsraten der Einzelplatten ermittelt.

Tabelle 21

Mit der Papillärmethode gemessene Mutationsrate

Stamm	Versuch	Testsubstanz Konzentr.	Σ Kol.	n	Homogenität Papill. Vertik. auf Platter	$\bar{x}$ $\pm$ GE	$\bar{N}$ $\pm$ GN
	101	Kontrolle	661	6	P = 37,5 %	0,725 $\pm$ 0,033	$7,40 \cdot 10^7$ $\pm$ 0,48
		8-Azasquanin 10 γ /ml	639	6	42 %	0,388 $\pm$ 0,025	5,38 $\pm$ 0,47
		5-Bromuracil 25 γ /ml	377	4	62 %	1,573 $\pm$ 0,064	6,76 $\pm$ 0,56
		TEM 10 ⁻² %	736	6	0,75 %	0,555 $\pm$ 0,027	5,68 $\pm$ 0,48
arg ₁	99	Kontrolle	988	6	92,5 %	0,773 $\pm$ 0,028	$6,06 \cdot 10^7$ $\pm$ 0,44
		NaNO ₂ 10 ⁻³ m	679	4	4 x 10 ⁻⁵	0,750 $\pm$ 0,033	5,72 $\pm$ 0,42
		10 ⁻⁴ m	516	3	12 %	0,535 $\pm$ 0,032	5,75 $\pm$ 0,42
		Äthylurethan 10 ⁻³ m	1040	6	58 %	0,562 $\pm$ 0,023	5,34 $\pm$ 0,41
	93	Kontrolle	686	4	31 %	0,487 $\pm$ 0,027	$5,00 \cdot 10^7$ $\pm$ 0,35
		Äthylenimin 10 ⁻⁴	364	2	46 %	0,863 $\pm$ 0,049	5,09 $\pm$ 0,35
		Diäthylsulfat 10 ⁻²	421	2	6 %	0,520 $\pm$ 0,035	3,85 $\pm$ 0,31
		10 ⁻³	328	2		0,455 $\pm$ 0,037	3,89 $\pm$ 0,31
		10 ⁻⁴	286	2		0,378 $\pm$ 0,036	4,72 $\pm$ 0,33
gly ₁	98	Kontrolle	1441	10	0,6 %	0,636 $\pm$ 0,021	$1,00 \cdot 10^8$ $\pm$ 0,056
		EMS 10 ⁻⁴	1580	10	4 x 10 ⁻⁴	0,776 $\pm$ 0,022	0,932 $\pm$ 0,054
		Hydroxylamin 10 ⁻⁴ m	915	6	26 %	0,813 $\pm$ 0,029	0,782 $\pm$ 0,050
96		Kontrolle	377	4	33 %	0,828 $\pm$ 0,047	$1,95 \cdot 10^8$ $\pm$ 0,090
		H ₂ O ₂ 10 ⁻⁶ + 10 ⁻⁷	273	3	30 %	0,996 $\pm$ 0,060	1,57 $\pm$ 0,057
		Formaldehyd 10 ⁻⁵	91	2	61 %	0,814 $\pm$ 0,094	1,47 $\pm$ 0,078
		10 ⁻⁶	141	2		0,908 $\pm$ 0,080	1,69 $\pm$ 0,084

nach Einwirkung verschiedener Mutagene

$\alpha \cdot 10^{-9}$ $\pm$ σ	P	
	t	χ
6,55 $\pm$ 0,285		
5,14 $\pm$ 0,39	1,5 % (u.K.)	10 %
15,98 $\pm$ 0,536	$< 2 \times 10^{-4}$	6×10^{-5}
6,98 $\pm$ 0,668	58 %	99 %
8,78 $\pm$ 1,023		
8,97 $\pm$ 1,05	90 %	89 %
6,35 $\pm$ 0,141	7,0 %	26 %
7,48 $\pm$ 0,199	24 %	32 %
6,77 $\pm$ 0,748		
11,71 $\pm$ 0,514	0,57 %	0,3 %
9,36 $\pm$ 0,584	6,0 %	3,5 %
7,99 $\pm$ 0,453	23 %	
5,47 $\pm$ 0,245	18 %	
4,48 $\pm$ 0,251		
5,75 $\pm$ 0,263	0,27 %	4,5 %
7,17 $\pm$ 0,143	$< 10^{-4}$	0,15%
2,97 $\pm$ 0,115		
4,48 $\pm$ 0,151	5×10^{-4}	0,8 % *)
3,89 $\pm$ 0,022	2,5 %	25 %
3,61 $\pm$ 0,234	7,0 %	22 %

*) In späteren
Versuchen nicht
bestätigt; siehe
Tabelle 20 u.23

Stamm	Versuch	Testsubstanz Konzentr.	Σ Kol.	n	Homogenität Papill. Vertlg. auf Platten	$\bar{x}$ $\pm 6\bar{x}$
gly ₁	noch 96	Contergan 1:100	128	2	15 %	0,977 $\pm 0,087$
		1:1000	203	2	89 %	0,980 $\pm 0,069$
		1:10000	118	2	32 %	1,077 $\pm 0,095$
		1:100000	156	2	16 %	0,943 $\pm 0,077$
leu ₁	102	Kontrolle	473	6	63 %	0,474 $\pm 0,032$
		Aceton 10 ⁻³	478	6	5,8 %	0,488 $\pm 0,032$
		Coffein 10 ⁻⁵ _m	530	6	32 %	0,510 $\pm 0,031$
	94	Kontrolle	406	4	32 %	0,486 $\pm 0,0346$
		N-Lost 0,1 %	113	2	81 %	0,560 $\pm 0,051$
		0,01 %	195	2		0,570 $\pm 0,054$
		0,001 %	111	2		0,558 $\pm 0,071$
		Thioharnstoff 10 ⁻³ +10 ⁻⁴ +10 ⁻⁵	349	6	5,5 %	0,556 $\pm 0,040$
		2-Aminopurin 10 ⁻⁴ _m	161	2	80 %	0,360 $\pm 0,047$
		10 ⁻⁵ _m	213	2		0,502 $\pm 0,048$
	95	Kontrolle	375	4	21 %	0,656 $\pm 0,042$
		Essigsäure 10 ⁻⁴ +10 ⁻⁵	340	4	19 %	0,632 $\pm 0,043$
		N-Methylurethan 10 ⁻³	116	2	30 %	0,923 $\pm 0,089$
		10 ⁻⁴	147	2		0,714 $\pm 0,069$
gly	88	Kontrolle	316	4	36 %	1,057 $\pm 0,057$
		β -Propiolakton 10 ⁻³ +10 ⁻⁴ +10 ⁻⁵	487	6	45 %	1,245 $\pm 0,050$

Tabelle 21

$\bar{N} \cdot 10^8$ $\pm \sigma_N$	$\bar{\alpha} \cdot 10^{-9}$ $\pm \sigma_{\bar{\alpha}}$	P	
		t	χ
1,68 $\pm 0,083$	3,84 $\pm 0,272$	4,5 %	10 %
1,24 $\pm 0,072$	5,48 $\pm 0,112$	$< 2 \times 10^{-4}$	0,3%
1,57 $\pm 0,081$	5,00 $\pm 0,805$	7,0 %	1,8%
1,27 $\pm 0,072$	5,15 $\pm 0,921$	8,0 %	0,9%
2,31 $\cdot 10^8$ $\pm 0,085$	1,39 $\pm 0,087$		
2,00 $\pm 0,092$	1,68 $\pm 0,167$	16 %	28 %
1,96 $\pm 0,090$	1,78 $\pm 0,150$	5,0 %	12 %
2,12 $\cdot 10^8$ $\pm 0,16$	1,58 $\pm 0,024$		
2,57 $\pm 0,17$	1,50 $\pm 0,017$	5,0 %	
1,42 $\pm 0,13$	2,77 $\pm 0,100$	$< 2 \times 10^{-4}$	
1,66 $\pm 0,14$	2,30 $\pm 0,120$	0,45%	
1,42 $\pm 0,132$	2,90 $\pm 0,341$	0,5 %	2,7 %
1,70 $\pm 0,14$	1,44 $\pm 0,141$	37 %	
1,27 $\pm 0,12$	2,74 $\pm 0,458$	4,5 %	
2,42 $\cdot 10^8$ $\pm 0,172$	1,91 $\pm 0,162$		
2,07 $\pm 0,16$	2,00 $\pm 0,176$	52 %	52 %
1,31 $\pm 0,13$	4,91 $\pm 0,240$	5×10^{-4}	
2,01 $\pm 0,15$	2,52 $\pm 0,103$	3,5 %	
1,00 $\cdot 10^8$ $\pm 0,058$	7,30 $\pm 0,292$		
1,06 $\pm 0,034$	8,09 $\pm 0,232$	7,0 %	42 %

6. 5. 2) Vergleich mit den Ergebnissen des Blättchentests

Ein Vergleich der Resultate im Papillentest mit denen der Blättchenmethode an den gleichen Stämmen zeigt nicht in allen Fällen Übereinstimmung (Tabelle 22).

T a b e l l e 22

Mutagenitätsnachweis der gleichen Chemikalien mit der Papillen- und der Blättchenmethode.

Stamm	Testsubstanz	Blättchen- test Resultat	Papillentest		
			Resultat	Geprüfte Konzentr.	
arg	Azaguanin	-	-		Angaben über die Prüfkonzen- tration im Papillentest nur bei Nichtüberein- stimmung der Resultate.
	BU	-	+	25 γ /ml	
	NaNO ₂	-	-		
	TEM	+	-	0,01 %	
	Äthylurethan	+	-	10 ⁻³ m	
	DES	+	(+)		
	Äthylenimin	+	+		
gly	Contergan	+	+		
	EMS	+	+		
	H A	-	+	10 ⁻⁴ m	
	Formaldehyd	+	(+)		
	H ₂ O ₂	-	(+)	10 ⁻⁷	
	β -Propiolakton	-	-		
leu	Essigsäure	-	-		
	Coffein	-	-		
	Aceton	-	-		
	Thioharnstoff	+	+		
	N-Lost	+	+		
	A P	+	(+)		
	N-Methylurethan	+	+		

+ = sichere Mutagenität

(+) = wahrscheinliche Mutagenität (5% > P > 1 %)

- = keine nachweisbare Mutagenität

Die Nichtübereinstimmung der Resultate bei Äthylurethan und H_2O_2 beruht wohl auf der Anwendung zu sehr verdünnter Chemikallösungen im Papillentest. Die Ergebnisse beider Methoden sind bei diesen Substanzen nicht vergleichbar. Die im Papillentest verwendeten Prüfkonzentrationen von BU, TEM und HA liegen im Bereich der auf das Blättchen aufgetragenen Testkonzentrationen. Die anscheinend widersprechenden Resultate haben sicherlich in der unterschiedlichen Methodik der Tests ihren Grund. Vielleicht führt bei TEM und Äthylurethan das ständige Nachströmen des Chemikals aus dem Blättchen zur häufigeren Mutationsauslösung im wachsenden Restwuchsrasen, während die in der Kolonie einer Papillentestplatte höher gelegenen Zellen nicht so stark der Mutageneinwirkung ausgesetzt sind und dadurch eine geringere Chance zu mutieren haben. Auffallend ist, dass BU beim Stamm arg und HA beim Stamm gly nur im Papillentest deutlich Mutationen auslösten, während BU beim Stamm leu auch im Blättchentest Mutagenität zeigte (Tabelle 11). Jedoch scheint sich hier die Annahme zu bestätigen, dass BU in hoher Konzentration bei arg im Blättchentest wuchshemmend und schwach mutagen ist, wobei die Zahl der induzierten Mutantenkolonien die der Kontrolle nicht übersteigt, in geringerer Konzentration aber die Wuchshemmung vorherrscht (Tabelle 11).

Die hier demonstrierten Resultate mit BU und HA besagen deutlich, dass ein negativer Befund im Blättchentest einen positiven im Papillentest nicht ausschließt. Im Mutagenitätstest müssen daher negative Blättchenresultate mit der Papillennmethode überprüft werden, und zwar systematisch über einen großen Konzentrationsbereich des geprüften Chemikals, da die mutationsauslösende Wirkung eventuell erst bei größerer Verdünnung des Prüfstoffes auftreten könnte (z.B. EMS bei gly in Tabelle 11).

6. 5. 3) Bewertung zu kleiner Plattenreihen

Werden in einem Mutagenitätsversuch zu kleine Plattenreihen z.B. 2 Platten angesetzt, so besteht bei gefundener Differenz gegenüber der Kontrolle die Möglichkeit, dass durch Zufall höhere Werte aus dem Kollektiv herausgegriffen worden sind, die den gesuchten Effekt vortäuschen. Der im großen Umfang wiederholte Versuch kann einen ebenfalls signifikanten, auf reproduzierbarer Mutagenität der Testsubstanz beruhenden Unterschied bringen; er kann aber auch keinen Unterschied zeigen, was auf zufällig gefundene hohe Werte in der ersten, kleinen Stichprobe deutet.

Die wegen zu geringer Plattenzahl unsicheren Ergebnisse von einigen Substanzen, wie N-Lost, AP, H_2O_2 und β -Propiolakton erforderten eine Wiederholung des Versuchs. Aus dem Vorversuch (je 2 Platten) konnte berechnet werden, wie groß der Versuchsumfang (Plattenzahl) sein muß, um bei gleicher (geringer) Erhöhung der Mutationsrate durch das Agens eine Sicherung des Unterschieds zu erhalten. Für die Vorausberechnung des Versuchsumfangs wurde folgende Formel verwendet: +)

$$\bar{\alpha}_{ch} = (1 + g) \cdot \bar{\alpha}_{sp}$$

g = Erhöhung der Mutationsrate über den Spontanwert

$$D = \bar{\alpha}_{ch} - \bar{\alpha}_{sp}$$

$\bar{\alpha}_{ch}$ = chemikalinduzierte mittlere Mutationsrate

$$= (1+g)\bar{\alpha}_{sp} - \bar{\alpha}_{sp} = g\bar{\alpha}_{sp} ;$$

$\bar{\alpha}_{sp}$ = mittlere spontane Mutationsrate

$$t = \frac{\bar{\alpha}_{ch} - \bar{\alpha}_{sp}}{s_D} = \frac{g\bar{\alpha}_{sp}}{s_D} ;$$

n = Plattenzahl

$$s_D = \sqrt{\frac{\sum \Delta_{ch}^2}{n_{ch}(n-1)} + \frac{\sum \Delta_{sp}^2}{n_{sp}(n-1)}}$$

D = Differenz zwischen spontaner und chemikalinduzierter Mutationsrate

t = Maß für die Abweichung, wird hier nach der gewünschten Signifikanz gewählt.

Wenn $n_{ch} = n_{sp} = n$, was angestrebt wird, dann ist

+) Diese Formel wurde von Herrn Professor Kaplan entwickelt.

$$s_D = \sqrt{\frac{\sum \Delta_{ch}^2 + \sum \Delta_{sp}^2}{n(n-1)}} \approx \frac{\sqrt{\sum \Delta_{ch}^2 + \sum \Delta_{sp}^2}}{\sqrt{n^2}} \quad \text{bei } n-1 \approx n$$

$$t = \frac{g \bar{\alpha}_{sp} \cdot n}{\sqrt{\sum \Delta_{ch}^2 + \sum \Delta_{sp}^2}}; \quad n = \frac{t}{g \bar{\alpha}_{sp}} \sqrt{\sum \Delta_{ch}^2 + \sum \Delta_{sp}^2};$$

Aus Vorversuchen muß $g \bar{\alpha}_{sp}$ sowie $\sum \Delta_{sp}^2$ und $\sum \Delta_{ch}^2$ bestimmt werden.

Analog dazu ist auch im Blättchentest eine Vorausberechnung der Plattenzahl n für einen gesicherten Unterschied möglich:

$$\bar{M}_{ch} = (1+g) \cdot \bar{M}_{sp}; \quad \Delta = g \cdot \bar{M}_{sp};$$

$$\chi = \frac{\Delta}{\sigma_{\Delta}} = \frac{g \cdot \bar{M}_{sp}}{\sigma_{\Delta}};$$

$$\sigma_{\Delta} = \sqrt{g^2 \sigma_{sp}^2 + \sigma_{ch}^2}; \quad \sigma = \sqrt{\frac{\bar{M}}{n}}; \quad \sigma^2 = \frac{\bar{M}}{n}$$

$$= \sqrt{\frac{\bar{M}_{sp}}{n_{sp}} + \frac{\bar{M}_{ch}}{n_{ch}}}; \quad \text{bei } n_{sp} = n_{ch} = n$$

$$= \sqrt{\frac{\bar{M}_{sp} + \bar{M}_{ch}}{n}}$$

$$= \sqrt{\frac{\bar{M}_{sp} + \bar{M}_{ch}}{n}};$$

$$\chi = \frac{g \cdot \bar{M}_{sp} \cdot \sqrt{n}}{\sqrt{\bar{M}_{sp} + \bar{M}_{ch}}}$$

$$\sqrt{n} = \frac{\chi \cdot \sqrt{\bar{M}_{sp} + \bar{M}_{ch}}}{g \cdot \bar{M}_{sp}}$$

$$n = \frac{\chi^2 \cdot \bar{M}_{sp} + \bar{M}_{ch}}{(g \cdot \bar{M}_{sp})^2};$$

g = Erhöhung der mittleren Mutantenkoloniezahl über den Spontanwert

$\bar{M}_{sp}$ = Mittelwert der Spontankontrolle

$\bar{M}_{ch}$ = Mittelwert der Chemikal-Platten

n = Plattenzahl

χ = Maß für die Abweichung

Aus Vorversuchen sind $g \cdot \bar{M}_{sp}$, $\bar{M}_{sp}$ und $\bar{M}_{ch}$ zu entnehmen.

Die aus Daten zu kleiner Papillmentestreihen vorausberechnete Koloniezahl n für $t = 8$, das schon bei 3 Freiheitsgraden mit $P = 0,4 \%$ gesichert ist, gab bei den oben erwähnten Substanzen im Wiederholungsversuch gegen vorher geänderte Ergebnisse (Tabelle 23).

T a b e l l e 23

Ergebnisse einiger aus Vorversuchen berechneten größeren Versuchsumfänge nach Mutagenbehandlung

Stamm	Teststoff	Vorversuch		vorausbe- rechnet n	Wiederholungsversuch		
		g	P		P	ΣM_1	n
gly	β -Propiolakt 10^{-5}	0,16	44 %	4,36	60 %	1031	7
	H_2O_2 10^{-6}	0,56	5,3%	2,62	17 %	705	5
leu	N-Lost 0,01 %	0,75	10^{-4}	1,06	1,2%	835	5
	AP $10^{-5}m$	0,73	4,5%	4,40	6 %	724	5

Das Resultat des Vorversuchs wird bei H_2O_2 nicht bestätigt, das von N-Lost ist unsicherer geworden, die Aussage über Mutagenität bei β -Propiolakton und 2-Aminopurin stimmt in beiden Versuchen etwa überein. Bei H_2O_2 , zum Teil auch bei N-Lost sind wohl in der zu kleinen Plattenreihe zufällig höhere Werte gefunden worden, die dem tatsächlichen Durchschnitt der geprüften Stichprobe nicht entsprechen.

Um nicht eindeutige Ergebnisse, wie sie bei zu kleinen Plattenreihen im obigen Beispiel gefunden wurden, zu vermeiden, sind größere Versuchsumfänge notwendig, weil in ihnen die abweichenden Einzelwerte besser ausgeglichen werden und einen genaueren Mittelwert liefern. Eine Plattenserie von 5 Platten ist als Mindestumfang zu betrachten, bei dem schon geringe Mutagenität gesichert werden kann (bei β -Propiolakton ergab die Vorausberechnung bei $g = 0,16$ für einen gesicherten Unterschied ein n von 5 Platten, (Tabelle 23).

6. 5. 4) Unterdrückung von Papillen in der Elterkolonie

Der Initiator der Papillenmethode, Ryan, erwog die Möglichkeit, dass nicht alle Mutationsereignisse als Papillen erfassbar sein könnten, spät oder tief im Innern der Kolonie stattgefundene Mutationen haben eine geringe Chance zu einer Papille zu führen und als solche erkannt zu werden. Er prüfte, ob nach 4 Tagen Inkubation alle Rückmutationen als Papillen sichtbar geworden sind oder nicht.

Bei der Ausplattung von 76 papillenfreien Kolonien, einzeln in 1 ml Saline suspendiert und als Ganzes auf Minimalagar gegossen, waren nur etwa 50 % der Kolonien ohne Mutationen (Ryan et al. 1955).

Bei Mutagenitätsversuchen mit der Papillenmethode sollte sich die Unterdrückung der Papillen bei der Kontrolle und bei den Testplatten aufheben, sofern sie etwa gleich ist. Dadurch würde der Mutagenitätsnachweis nicht unsicher. Nach obigem Vorbild wurden 10 papillenfreie leu-Kolonien der Spontankontrolle und 10 ebensolche aus äthyleniminhaltigen Platten ausgestochen und auf Minimalagar ausgegossen. Die nach 2 Tagen Bebrütung gefundenen Ergebnisse bringt Tabelle 24.

T a b e l l e 24

Mutationsereignisse in je 10 papillenfreien und papillenträgenden Kolonien auf chemikalbehandelten und unbehandelten Platten

Testplatten	Papillenfreie Kolonien		Papillenkolonien k	Gesamt-k ($k_{P_0} + k_{Pap}$)
	m. Prototroph	k (nach P_0)		
Kontrolle	4	0,717=54,5 %	0,603 = 45,5 %	1,32
Äthylenimin	5	0,690=47,0 %	0,770 = 53 %	1,46

Berechnet ist die durchschnittliche Häufigkeit der Mutationsereignisse pro Kolonie K bei den papillenfreien Kolonien aus der Zahl der Platten ohne Prototrophievarianten nach der Nullkulturmethode $P_0 = e^{-K}$, $K = -\ln P_0$, bei den papillenträgenden durch deren Auszählung. Ein prozentueller Vergleich zeigt eine nahezu gleiche Unterdrückung von Papillen bei Äthyleniminplatten und bei der Kontrolle, die etwa die Hälfte aller Mutationen ausmacht, ähnlich wie bei Ryan. Eine Vernachlässigung des Unterdrückungsfaktors ist also zulässig.

III. Theoretischer Teil

1.) Der Prüfstoff im Mutagenitätstest

1. 1.) Die Reinheit des einwirkenden Chemikals

Das zu prüfende Chemikal wurde in gepufferter Saline gelöst und verdünnt. Einige Substanzen, wie MnCl_2 und HgCl_2 reagierten mit Na_2HPO_4 des Puffergemisches und bildeten einen Niederschlag, wodurch ein Teil des gelösten Stoffes für den Versuch ausfiel. Es können jedoch unter den vielen gebrauchten Chemikalien lösliche Reaktionsprodukte oder komplexe Verbindungen mit den Stoffen des verwendeten Mediums gebildet werden, die ebenfalls in das Bakterium gelangen. Da das Ausmaß der gebildeten löslichen zusätzlichen Produkte im Minimalagar nicht bekannt ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die gefundene mutagene Wirkung wenigstens zum Teil diesen Verbindungen zugehört.

Die Verwendung von Filterpapierblättchen bietet zusätzlich die Möglichkeit, dass aus dem Blättchenmaterial unbekannte Stoffe herausgespült werden, die mit dem Testchemikal mutagene Produkte geben könnten. Dies kann durch mehrfaches Waschen der Blättchen in destilliertem Wasser (wie es in den durchgeführten Versuchen geschah) zumindest vermindert oder in den Testmethoden ohne Blättchen ganz ausgeschaltet werden.

Das Vermischen der Testsubstanz mit gepufferter Saline und danach mit den Salzen des Minimalagars ließ sich in den hier durchgeführten Versuchen nicht umgehen, da die Prüfstoffe auf sich teilende Bakterien einwirken sollen, damit z.B. Basenanaloga während der DNS-Verdoppelung in diese eingebaut werden können. Ausserdem ist für die Überführung der induzierten Prämutation in eine perfekte Mutation wie auch für die Phänausprägung DNS-Verdoppelung und Stoffwechsel notwendig. Das erforderliche Bakterienwachstum ist jedoch nur bei Zufuhr von Nährstoffen zu erreichen.

In Wasser wenig lösliche Substanzen wurden in reinem Aceton gelöst und im Blättchentest auf Mutationsauslösung geprüft. Das Aceton verflüchtigte sich teilweise beim Aufträufeln der Testlösung und der gelöste Stoff bildete einen Verdampfungsrückstand auf und um das Blättchen, wodurch die Übersichtlichkeit der Versuche leidet. Wegen der geringen Chance des Eindringens von wasserunlöslichen Stoffen in die Zelle gegenüber ihrer wasserlöslichen Form, sollte sich die Mutagenitätsprüfung auf letztere beschränken.

1. 2.) Die Wirkung des Prüfstoffes in der Zelle

Im Mutagenitätstest muss das Chemikal in die Zelle eintreten und zunächst das Cytoplasma passieren, bevor es auf die Gene trifft. An beiden Zellteilen kann es toxisch wirken. Solche Giftwirkung war bei den Stoffen HgCl_2 , Formaldehyd, β -Propiolakton, Hydrochinon und Pyrogallol in deren höheren Konzentrationen an der Hemmhofbildung im Bakterienrasen zu erkennen. Ausser dieser völligen Wuchshemmung bei obigen Stoffen verursachen die meisten übrigen geprüften Chemikalien eine Verlangsamung des Elterwachstums; die Zellzahl in den chemikalbehandelten Kolonien war im Papillentest meist geringer als in der unbehandelten Kontrolle (Tabelle 21).

Im Cytoplasma kann der Prüfstoff abgebaut, wie H_2O_2 durch Katalase (z.B. Auerbach 1962), oder auch zum Mutagen umgebaut werden (indirekte Mutagene), wie z.B. für TEM vermutet wird (Iorkiewicz und Szybalski 1961), und schliesslich kann er direkt, wie z.B. NaNO_2 , BU, AP (Übersicht bei Freese 1963) oder indirekt, wie vielleicht MnCl_2 (Demerec und Hanson 1951) am Erbmateriel solche Veränderungen hervorrufen, die eine Mutation zur Folge haben.

Es ist daher verständlich, dass eine Mutagenitätsprüfung von Chemikalien an isolierter DNS anzureichend wäre; denn

einerseits kann eine DNS-mutierende Substanz in der Zelle vom Protoplasma unwirksam gemacht werden oder auch tödlich wirken, andererseits kann ein gegen die DNS inaktiver Stoff erst in der Zelle zum Mutagen umgewandelt werden und dann dies Produkt DNS verändern. Eine Prüfung von Chemikalien auf ihre mutationsauslösende Wirkung muß also für das gesetzte Ziel an lebenden Zellen vorgenommen werden. Mutagenitätsversuche an Phagen werden als direkte Einwirkung des Chemikals auf die DNS betrachtet und können nur als Hinweise auf potentielle Mutationsauslösung durch den Stoff bei echten Organismen dienen.

5. Die Wirkungsmechanismen von Mutagenen

Der Mechanismus der Mutationsauslösung ist bereits bei einer Reihe von Chemikalien an Viren erforscht und konnte zum Teil an Bakterien bestätigt werden (ausführliche Übersicht bei Freese 1963). Bei Bakteriophagen nimmt Freese zwei Mechanismen der Mutationsauslösung an: die Transition, das ist Ersatz eines Purins in der DNS durch ein anderes Purin, bzw. eines Pyrimidins durch ein anderes Pyrimidin, und die Transversion, das ist Ersatz eines Purins durch ein Pyrimidin und umgekehrt, die auch für Bakterien gelten (Demerec et al. 1960; Rudner und Balbinder 1960; Strelzoff 1961). Einige Chemikalien, wie Äthyläthansulfonat, Diäthylsulfat, NaNO_2 (Freese 1959 a) sind in der Lage, beide Mutationsarten auszulösen, andere, wie AP, BU und HA induzieren 94 - 98 % Transitionen (beim Phagen T_4 , Freese 1959 b), Proflavin wiederum löst 98 % Nichttransitionen bei T_4 -Phagen aus (Brenner et al. 1958). Die Resultate von Versuchen an Phagen haben gezeigt, dass eine Transitionsvorwärtsmutation nur durch eine Transition wieder zurückmutiert.

Damit im Mutagenitätstest die Chemikalien, die eine Transition auslösen, auch festgestellt werden können, müssen sie

an einer durch Transition entstandenen Mutante geprüft werden. Anhand der Resultate einiger Mutagene, deren Mutationsmechanismus bereits bekannt ist, soll untersucht werden, ob und welche der 3 spontanen Serratiamutanten durch Transition entstanden sind (Tabelle 25).

T a b e l l e 25

Resultate mit Mutagenen bekannter Wirkungsweise an 3 Mutantenstämmen von Serratia.

Mutagene	Serratia - Mutanten		
	gly	arg	leu
BU	-	+	+
AP	-	+	+
DES	-	+	-
HA	+	-	-
NaNO ₂	+	-	(+)
Acridin	+	-	-
Acriflavin	+	(+)	+

+ = gesicherte Mutationsauslösung

(+) = wahrscheinliche "

- = keine nachweisbare "

Die Resultate mit BU, AP, zum Teil auch DES sprechen dafür, dass die Prototrophiemutationen bei den Stämmen arg und leu Transitionen sind. Das Resultat mit Acridin besagt, dass der Stamm gly wohl durch eine spontane Nichttransition entstanden ist und daher nicht durch Basenanaloga (BU, AP) zur Prototrophie zurückmutiert. Acriflavin, ein Derivat des Acridins gibt keine klare Auskunft, vielleicht löst es Transitionen und Nichttransitionen aus. Die Mutagene NaNO₂ und HA lösen zwar hauptsächlich Transitionen aus, jedoch wurden 6 - 13 % Nichttransitionen von Freese beobachtet; es

wäre möglich, dass in unserem Falle Nichttransitionen durch NaNO_2 und HA induziert wurden.

Die beim Phagen T_2 (Vielmetter, Schuster u. Wieder 1960) sowie beim Tabakmosaik-Virus (Schuster, Gierer und Mundry 1960) näher untersuchte mutagene Wirkung von NaNO_2 beruht auf einer Desaminierung der Basen in der Erbstruktur (DNS, bzw. RNS) und nachfolgender geänderter Basenpaarung während ihrer Reproduktion in der Wirtszelle, wodurch eine andere genetische Information entsteht. Die Desaminierung durch die in der NaNO_2 -Lösung entstehenden salpetrigen Säure erfolgt nach diesen Autoren nur bei niederem pH (4,2 - 4,8). Die Rückmutationsauslösung bei neutralem pH durch NaNO_2 in den hier durchgeführten Versuchen dürfte also wohl nicht durch Desaminierung NH_2 -haltiger Basen, sondern durch einen anderen, nicht näher bekannten Prozess geschehen sein.

Es darf aufgrund der obigen Resultate vermutet werden, dass die Stämme arg und leu durch Transition, der Stamm gly durch Nichttransition zurückmutieren. Die Zusammenstellung dieser 3 Stämme in die Reihe von Testorganismen ist daher günstig: es können mit ihnen transitionsauslösende Chemikalien wie auch solche, die Nichttransitionen verursachen, aufgedeckt werden.

1. 4.) Photodynamische Wirkung von Prüfstoffen

Einige Chemikalien üben bei Belichtung an der DNS eine photodynamische Wirkung aus. So sind mit BU markierte Phagen empfindlicher gegen Inaktivierung durch UV und sichtbares Licht. (Litman und Pardee 1960; Stahl et al. 1961). Nach Webb und Kubitschek (1963) ist Acridinorange bei E.coli im Licht stark mutagen, im Dunkeln dagegen antimutagen.

Die photodynamische Wirkung des Chemikals ist als störender Nebeneffekt im Mutagenitätstest auszuschliessen. In allen

hier beschriebenen Blättchen-Versuchen wurden die Chemikalien bei Tageslicht auf die beimpfte Testplatten gebracht und danach sofort in die dunkle Brutkammer gestellt. Auf Papillentestplatten, die den Prüfstoff in der Agarschicht enthielten, wurde die Bakteriensuspension innerhalb etwa einer halben Stunde ausgespatelt und anschliessend im Dunkeln 4 Tage lang bebrütet. Es kommt wohl kaum infrage, dass während dieser kurzen Lichteinwirkung auf die Testplatten am Anfang die Chemikalien bis zum Bakterium diffundiert und in der Zelle photodynamisch wirksam werden könnten; während der Bebrütung und also Mutationsentstehung war photodynamische Wirkung ausgeschlossen.

Die Ergebnisse mit Acriflavin und Acridin zeigten keine antimutagene Wirkung im Dunkeln, vielmehr war starke Mutationsauslösung deutlich, im Gegensatz zu den Befunden von Webb und Kubitschek (Tabelle 11). Auch in einem zur Orientierung durchgeführten Papillenversuch induzierte Acriflavin sehr viele, zum Teil zusammenfliessende Papillen, die sicher erst in der wachsenden Kolonie, also in der Dunkelheit, entstanden sind.

2.) Das Bakterium im Mutagenitätstest

Unter den 8. geprüften *Serratia*-Auxotrophen mit geringer spontaner Rückmutationsrate konnten 3 Stämme mit unterschiedlichen mutierten Genen ausgewählt werden, die insgesamt auf alle der einwirkenden Mutagene von recht verschiedener Struktur angesprochen haben (Tabelle 3). In den späteren Versuchen mit einer erweiterten Anzahl von Mutagenen und einigen bisher nicht geprüften Stoffen bestätigte sich die Eignung der 3 Stämme gly, arg und leu für den Mutagenitätstest; an ihnen konnte bei Anwendung der beschriebenen Testmethoden von 36 Chemikalien nur mit 4 als Mutagene schon bekannten Stoffen keine Mutation ausgelöst werden (siehe näher unter Ergebnisse).

Von den drei geeigneten Stämmen war der Stamm leu voll-auxotroph, die Stämme gly und arg (unterschiedlich) leaky. Der leaky-Zustand ist für die gewählte Versuchstechnik günstig, da diese Stämme für den notwendigen Restwuchs keinen Wuchsstoffzusatz benötigen. Für den Nachweis von Mutagenität jedoch können vollauxotrophe Stämme unter Umständen den zusätzlichen Vorteil bieten, dass auch der Mutationsschritt zum leaky Zustand neben dem zur vollen Prototrophie beobachtet werden kann und beide Mutationsschritte durch Mutagene unterschiedlich ansprechbar sein können, wie es am Stamm leu gefunden wurde.

Acriflavin induzierte beim Stamm leu nur leaky Kolonien, dagegen keine oder sehr wenig Vollprototrophievarianten; hier liegt wohl eine elektive Induktion von leaky Mutanten vor. Die etwa gleich häufige Auslösung von leaky und Prototrophievarianten nach Äthylenimineinwirkung beim Stamm leu deutet auf unabhängige Mutationen an 2 Loci: ein Mutationsschritt vom auxotrophen zum prototrophen Zustand und ein anderer vom auxotrophen zum leaky Zustand.

Es können also an den beschriebenen Stämmen nach Mutagen-
einwirkung 3 verschiedene Phänveränderungen beobachtet wer-
den:

- a) von Auxotrophie zur Prototrophie : - $\longrightarrow$ +
- b) von Auxotrophie zum leaky Zustand: - $\longrightarrow$ (1)
- c) vom leaky Zustand zur Prototrophie: - (1) $\longrightarrow$ +

Die Fälle a und b wurden am vollauxotrophen Stamm leu fest-
gestellt, der Fall c an den leaky Stämmen gly und arg. Der
Grad der Leakiness kann natürlich bei verschiedenen Stäm-
men oder Mutationsschritten verschieden sein.

3.) Methoden der Mutagenitätsprüfung

3. 1.) Versuchstechnische Methoden

Die in Tabelle 11 zusammengestellten Ergebnisse machen deutlich, dass die für die Mutationsauslösung nötige Stoffmenge nicht nur für jede Substanz eine andere ist, sie ist auch in vielen Fällen beim gleichen Chemikal von Stamm zu Stamm unterschiedlich. In Versuchen mit EMS, NaNO_2 , Äthylurethan und E_{39} am Stamm gly, mit Fuchsin und MnCl_2 am Stamm leu und mit TEM und Malachitgrün am Stamm arg wurde Mutationsauslösung nur im niederen Konzentrationsbereich des Chemikals gefunden (Tabelle 11).

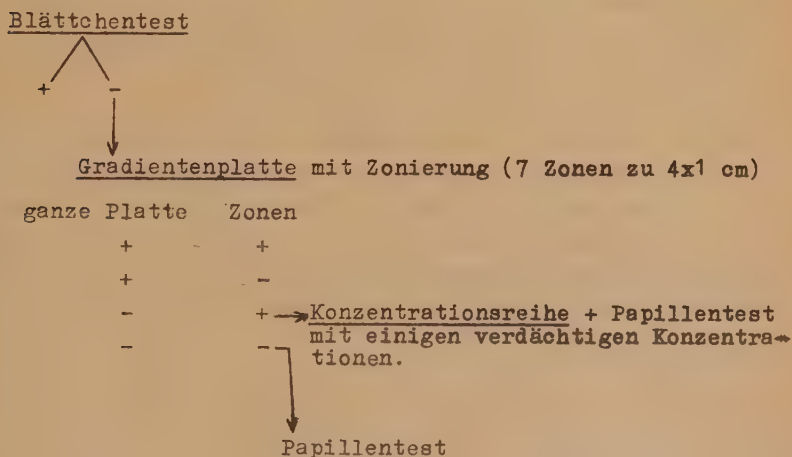
Die für eine Mutagenitätsprüfung an Bakterien vorgesehene Versuchsmethodik hat also einen großen Konzentrationsbereich des Teststoffes zu untersuchen. Testplatten mit einem Konzentrationsgefälle zeigen in Verdünnungsstufen hintereinandergeschaltet eventuelle Wuchshemmung und deutlich Mutationsauslösung auch in einem engen Konzentrationsbereich an. Der Blättchentest, der voll brauchbare, wenn auch nur grob quantitative Ergebnisse liefert, hat gegenüber der genaueren Gradientenplatte den Vorteil der einfacheren Ausführung und Anwendung höchstmöglicher Konzentrationen, da der Konzentrationsabfall sehr steil ist. Die Auswertung von Platten mit Hemmhof infolge Giftwirkung des Teststoffes ist bei der Blättchentestplatte möglich. Die Auswertung von Diffusionszonen auf der Blättchenplatte hat sich nicht bewährt, da in allen gefundenen Fällen erhöhter Mutantenkoloniezahl in den Zonen die Gesamtplatten-Auswertung ebenfalls gesicherte Mutagenität aufweist.

Testplatten mit homogener Chemikalkonzentration sind zur Prüfung einer Serie verdünnter mutagenitätsverdächtiger Einzelkonzentrationen (Konzentrationsserientest) anwendbar.

Eine auf Papillentestplatten durchgeführte zusätzliche Mutagenitätsprüfung von 8 im Blättchentest als nicht mutagen be-

fundenen Substanzen brachte in zwei Fällen positive Ergebnisse (BU beim Stamm arg und HA beim Stamm gly; Tabelle 22). Damit hat sich die Anwendung der Papillenmethode zur Überprüfung von negativen Resultaten einfacherer Testmethoden als notwendig erwiesen.

Nach den Befunden der ausprobierten Methoden wäre ein Mutagenitätstest nach folgendem Schema durchzuführen:



bereich, beginnend mit der schwach wuchshemmenden Konzentration, die aus der Gradientenplatte ersichtlich ist. Beim negativen Papillentest ist eine Prüfung auf Unterdrückung (Wuchshemmung) der induzierten Papillen durch das Chemikal durchzuführen. Eine eventuelle Papillenunterdrückung würde dann die Mutagenitätsprüfung mit Hilfe der Nullkulturmethode an den ausgestochenen Kolonien der Papillentestplatte erfordern. Erst beim negativen Befund im auf Papillenunterdrückung überprüften Papillentest kann ausgesagt werden, dass eine Mutagenität des Prüfstoffes beim verwendeten Bakterium und für den untersuchten Mutationsschritt zur Prototrophie nicht nachgewiesen werden konnte.

Je länger die Serie der Testorganismen im Mutagenitätstest ist, desto seltener werden die umständlicheren Methoden nötig, welche stammspezifische Störfaktoren (Wuchshemmung, Prototrophenunterdrückung u.s.w.) ausschalten sollen. Denn dann wird immer unwahrscheinlicher, dass sich diese Störfaktoren in allen Fällen so auswirken, dass vorhandene Mutagenität verdeckt bleibt.

3. 2.) Statistische Methoden

Die statistische Sicherung eines Unterschiedes in der Mutationsauslösung nach Chemikaleinwirkung kann beim Blättchentest, bei der Gradientenplatte und im Konzentrationsserientest mit der χ^2 -Zerlegung und mit dem χ -Test vorgenommen werden. Der χ -Test liefert, wie sich zeigte, auch bei Inhomogenität der Plattenwerte in einer Plattenreihe von der χ^2 -Zerlegung nicht merklich abweichende Ergebnisse, so daß die Anwendung des einfach zu berechnenden χ -Tests für den Signifikanznachweis genügt.

Ein Unterschied in den mit der Papillenmethode gemessenen Mutationsraten ist am einfachsten nach dem t-Test zu be-

rechnen; der χ -Test erfordert dagegen umständliche Berechnungen der Fehlerschwankungen von Papillenhäufigkeit und Zellzahl der Kolonien.

Die Anzahl der Platten in einer Testreihe soll mindestens 5 Platten betragen. Bei zu kleinen Plattenreihen können durch Zufall bessere (höhere) oder auch umgekehrt schlechtere (geringere) Werte aus dem Kollektiv herausgegriffen worden sein, die dem tatsächlichen Durchschnitt des Kollektivs nicht entsprechen und also falsche Resultate liefern.

In einigen Fällen waren die Parallelplatten einer Serie signifikant untereinander inhomogen hinsichtlich des Ausmaßes der auf ihnen angezeigten Mutationshäufigkeiten. Bei sorgfältig angestrebter Gleichartigkeit aller Bedingungen, z.B. Agarmengen, Inokulatgrößen, Stoffkonzentrationen, ist diese Ungleichheit der Platten jedoch so gering, dass sie sich auf die Signifikanz von Mutationshäufigkeiten nicht merklich auswirkt.

Im Papillentest (und auch im Blättchentest) kann aus den geringfügig über die Kontrolle erhöhten Werten zu kleiner Plattenreihen der Umfang des Wiederholungsversuchs für eine Sicherung der Mutagenität berechnet werden.

Für die Beurteilung der Zufallswahrscheinlichkeit werden meist die folgenden Grenzen verwendet:

- $P > 5\%$ = zufällige Abweichung,
- $P = 1\% - 5\%$ = wahrscheinliche Abweichung,
- $P = 1\% - 0,27\%$ = sichere Abweichung,
- $P < 0,27\%$ = sehr sichere Abweichung.

Da bereits "wahrscheinliche" Mutagenität einer Substanz für den Menschen schädlich sein könnte, sollten schon Chemikalien mit $P = 5\%$ im Mutagenitätstest als "mutagenitätsgefährlich" bezeichnet und (nach Prüfung weiterer Gesichtspunkte) von der Aufnahme in den Körper ausgeschlossen werden.

3. 3.) E r g e b n i s s e der Mutagenitätsprüfungen

Die mit den beschriebenen versuchstechnischen und statistischen Methoden an den 3 ausgewählten Stämmen gewonnenen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Von den 36 untersuchten Chemikalien konnte bei 28 Substanzen (= 78 %) die Mutagenität mit $P \leq 1\%$ gesichert werden; bei HgCl_2 , Na-Desoxycholat, Aceton und Methylcholanthren war sie wahrscheinlich ($1\% < P < 5\%$).

Wird $P = 5\%$ als Kriterium der Mutagenität gewählt, so wurden 89 % der Stoffe als mutationsauslösend befunden. Von den im Blättchentest an allen 3 Stämmen nichtmutagenen 5 Chemikalien, wie H_2O_2 , HA, 8-Azaguanin und die wasserunlöslichen Stoffe β -Naphthylamin und Dibenzanthracen wurden die ersten drei wasserlöslichen dem Papillentest unterzogen. Hydroxylamin erwies sich hierbei als mutagen, H_2O_2 und Azaguanin dagegen nicht. Alle hier erstmalig geprüften Stoffe, nämlich Fuchsin, Alizarinengelb GG, 4-Amino-2-Thiouracil, N-Methylurethan, Thioharnstoff und Contergan induzierten Mutationen.

4.) Elektivität

Als Elektivität wird das Mutieren bevorzugter DNS-Basenpaare, Allele oder Gene durch ein mutationsauslösendes Agens bezeichnet. Es wurden bei Mikroorganismen verschiedene Typen von Elektivität beschrieben, wie:

- a) intragenische Elektivität, z.B. Allelelektivität (Glover 1956),
- b) intergenische Elektivität = Genelektivität (z.B. Demerec bei E-coli, 1953; Westergaard bei Neurospora, 1957),
- c) Spezieselektivität = Zelltypelektivität, wenn ein Chemikal nur bestimmte Zelltypen, z.B. Stämme, mutiert.

Als Ursache der Elektivität wird die Nukleotidanordnung nächst der mutierten Base in der DNS, wie auch das Auftreten besonderer Basen (5-Methylcytosin und 5-Hydroxymethylcytosin) in ihr angenommen. Es ist jedoch auch denkbar, dass zur Elektivität auch außerhalb der DNS ablaufende Schritte der Mutagenese führen könnten (Auerbach 1962; Kaplan, R.W., Beckmann und Rüger 1963; Freese 1963).

Aus den Resultaten der durchgeführten Versuche sind zahlreiche Beispiele für Elektivität ersichtlich. In Tabelle 3 weist der Stamm ad, der nur mit Thioharnstoff und AP zurückmutiert, sehr starke Mutagenelektivität auf. Starke Stämmelektivität demonstriert Pyrogallol, das von den 8 geprüften Stämmen nur beim Stamm gly Rückmutationen auslöste. Auf intragenische Elektivität deuten die unterschiedlichen Ergebnisse bei den Allelen des arg-Gens, arg_1 und arg_3 . Alle verwendeten Stämme zeigen in den Tabellen 3 und 11 Zelltypelektivität, wobei meist Mutagen- und Stammelektivität kombiniert auftreten.

Die Ergebnisse des Blättchentests mit BU und HA in Tabelle 11 geben nicht genau die tatsächliche Elektivität dieser

Stoffe wieder; sie wird durch die Ergebnisse der Papillennmethode korrigiert, so dass BU auch beim Stamm arg und HA beim Stamm gly mutagen ist. Eine Aussage über Elektivität ist also erst möglich, nachdem die Mutagenität eines Stoffes mit verschiedenen Methoden geprüft worden ist.

Ein anderer Typ von Elektivität scheint durch das bevorzugte Auslösen von leaky Mutanten beim Stamm leu durch Acridin vorzuliegen. Sie betrifft den Mutationsschritt in eine andere Richtung als zur vollen Anauxotrophie; die Bezeichnung "Richtungselektivität" wäre hier vielleicht passend.

Das elektive Einwirken der Mutagene auf die verwendeten Stämme läßt die Einbeziehung einer Reihe von verschiedenen Stämmen in den Mutagenitätsnachweis eines Chemikals als notwendig erscheinen.

IV. Zusammenfassung

Für die routinemässige Prüfung von Chemikalien auf Mutationsauslösung wurden an *Serratia marcescens* verschiedene Methoden auf ihre Brauchbarkeit untersucht.

Aus 8 auxotrophe Mutanten wurden die drei Stämme gly, arg und leu (ihre spontanen Mutationsraten liegen im Bereich von 1,4 bis $8,8 \times 10^{-9}$) ausgewählt, die sich in der Empfindlichkeit gegenüber 22 getesteten strukturell sehr verschiedenen Mutagenen ergänzen. Die Stämme gly und arg erwiesen sich als nichtvollauxotroph (leaky), was für die Versuchstechnik vorteilhaft ist. Der vollauxotrophe Stamm leu braucht für den beim Test notwendigen geringen Restwuchs 1 γ Leucin pro ml Medium.

Im Blättchentest diffundiert die in einem Filterpapierblättchen aufgetragene Testlösung in das beimpfte Medium und induziert eventuell Rückmutationen in den Zellen der Weichagarschicht, die als größere Kolonien meist in der Nähe des Blättchens erscheinen. Mit 36 verschiedenen Chemikalien, von denen 30 schon als mutagen bekannt waren, wurde diese Methode an den 3 ausgewählten Stämmen auf Eignung im Mutagenitätstest untersucht. Die mutationsauslösende Stoffkonzentration war meist von Stamm zu Stamm unterschiedlich, bei Formaldehyd lag sie in einem engen Konzentrationsbereich. Giftige Stoffe, wie HgCl_2 , Formaldehyd, β -Propiolakton, Hydrochinon und Pyrogallol bildeten in hohen Konzentrationen einen Hemmhof um das Blättchen und erschwerten so u.Umständen die Auswertung.

Im Blättchentest mutagenitätsverdächtig erscheinende Stoffkonzentrationen konnten auf der Gradientenplatte genauer festgestellt und dann in einer Plattenserie mit wenig abweichenden homogenen Einzelkonzentrationen (Konzentrationsserientest) überprüft werden.

Mit der Papillenmethode ist es möglich, schon schwache Mutationsauslösung bei Wuchshemmung des Eltertyps festzustellen. Die für die spontane Papillenausbildung günstige suboptimale Wuchsstoffmenge pro ml Medium war 5 γ Leucin für den Stamm leu, 1 γ Arginin für den Stamm arg und 20 γ Glycin für den Stamm gly. Der Teststoff wurde dem Agarmedium beigegeben und erhöhte bei Mutagenität die Häufigkeit der als Papillen manifestierten Mutationsereignisse. Die zur Berechnung der Mutationsrate nötige Zellzahl in den papillenfremen Kolonien wurde mit der Zählkammer bestimmt. Dies ist für jede geprüfte Chemikalkonzentration gesondert durchzuführen, da der Teststoff die Zellzahl in den Kolonien meist verringert. Eine Unterdrückung der Papillen um etwa die Hälfte war in den Kolonien der Kontrolle wie auch der Äthyleniminbehandelten Platten zu beobachten; sie kann vernachlässigt werden, weil sie in beiden Plattenreihen etwa gleich ist.

Der mit 20 Substanzen durchgeführte Papillentest bestätigte nicht die im Blättchentest gefundene Mutagenität von TEM und Äthylurethan beim Stamm arg, dagegen offenbarte er die Mutagenität von BU und HA, die im Blättchentest nicht nachzuweisen war.

Die verwendeten Mutagene induzierten bei den Testorganismen Rückmutationen zur Prototrophie; bei Versuchen mit Acriflavin, zum Teil auch Formaldehyd und Äthylenimin waren die Rückmutanten des (vollauxotrophen) Stammes leu z.T. nicht vollprototroph, sondern leaky.

Der Signifikanznachweis nach Mutationsauslösung wurde für die einzelnen Testmethoden untersucht. Im Blättchentest, den Gradientenplatten, und dem Konzentrationsserientest ist die Streuungszurlegung mit dem χ^2 -Test sowie der einfacher zu berechnende χ -Test (auch bei Inhomogenität in der geprüften Plattenreihe) anwendbar. Im Papillentest ist die Signifikanzprüfung nach dem t-Test brauchbar.

Für die routinemässige Mutagenitätsprüfung von Chemikalien war eine bei allen Mutagenitätsmechanismen anwendbare Testmethode nicht zusammenzustellen. Es müssen beide Methoden, die einfachere Blättchenmethode als gröberer Mutagenitätstest und beim negativen Ergebnis der umständlichere Papillentest angewandt werden. Die Gradientenplatte und der Konzentrationsserientest können zur Überprüfung mutagenitätsverdächtiger Stoffkonzentrationen herangezogen werden.

Mit Hilfe der beschriebenen versuchstechnischen und statistischen Methoden konnte bei 36 Chemikalien (wovon 30 schon als mutagen bekannt waren) die Mutagenität in 28 Fällen (= 78 %) mit einer Zufallswahrscheinlichkeit von $P \leq 1\%$ gesichert werden; HgCl_2 , Aceton, Methylcholanthren und Na-Desoxycholat waren ($P = 1\%$ bis 5%) wahrscheinlich mutagen. Dibenzanthracen und β -Naphthylamin waren im Blättchentest (nur dort geprüft), H_2O_2 und 8-Azaguanin auch im Papillentest nicht mutagen. Die Mutationsauslösung durch 6 bisher nicht geprüfte Verbindungen, und zwar Fuchsin, Alizarin-gelb GG, 4-Amino-2-Thiouracil, N-Methylurethan, Thioharnstoff und Contergan wurde festgestellt.

Die Vermischung der Testsubstanz mit den Salzen des Mediums, die photodynamische Wirkung einiger Stoffe und der Wirkungsmechanismus einiger Mutagene bei den drei auxotrophen Serratia-Stämmen wurde diskutiert. Die Eignung von leaky Stämmen für den Mutagenitätstest wurde erörtert. Auf die aus den Ergebnissen ersichtlichen Typen von Elektivität wurde hingewiesen.

Die experimentellen Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden im Institut für Mikrobiologie der Johann-Wolfgang-Goethe - Universität zu Frankfurt am Main in den Jahren von 1961 bis 1963 durchgeführt.

Dem Institutsdirektor, Herrn Professor Dr.phil. R. W. Kaplan bin ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes, für seine kritische Anleitung bei der Durchführung der Versuche sowie für die anregenden Diskussionen zu grossem Dank verpflichtet.

V. Literaturverzeichnis

1. AHMED , S.J. 1963, Dissertation der Naturwissenschaftl. Fakultät, Frankfurt/Main.
2. AUERBACH, C., 1960, Chemical mutagenesis in animals. Chemische Mutagenese, Abh. Dtsch.Akad.Wissensch., Klasse für Medizin, S.1-13.
3. AUERBACH, C., 1962, Mutagenesis with particular reference to chemical factors. Mutations, second conference on genetics. Editor: Schull, W.J., 78-166, University Michigan Press.
4. AUERBACH, C. und WESTERGAARD, M., 1960, A discussion of mutagenic specificity. Chemische Mutagenese, Abh. Dtsch. Akad. Wissensch., Klasse Medizin, S. 116 - 123.
5. BARTHELMESS, A., 1956, Mutagene Arzneimittel. Arzneimittelforschg. 6, 157 - 168.
6. BARTHELMESS, A. und LÜCK, H., 1958, Lebensmittelzusatzstoffe und mutagene Wirkung. III. Objekte und Methoden zum Nachweis mutagener Wirkungen von Lebensmittelzusatzstoffen und die Möglichkeit von Rückschlüssen auf die dysgenische Gefährdung des Menschen. Zeitschr. Lebensmittel-Untersuchg. u.-Forschg. 107, 344-352.
7. BATEMAN, A.J., 1960, The induction of dominant lethal mutations in rats and mice with triethylenemelamine (TEM). Genet. Res., Camb. 1, 381-392.
8. BENZER, S. und FREESE, E., 1958, Induktion of specific mutations with 5-bromouracil. PNAS 44, 112-119.
9. BRAUN, W., 1953, Bacterial Genetics, p.63. Saunders Comp. Philadelphia, London.
10. BRENNER, S., BENZER, S. und BARNETT, L., 1958, Distribution of proflavine-induced mutations in the genetic fine structure. Nature 182, 983-985.
11. CRICK, F.H.C., BARNETT, L., BRENNER, S. und WATTS-TOBIN, R.J., 1961, General nature of the genetic code for proteins. Nature 192, 1227-1232.
12. D'AMATO 1950, Studio statistico dell'attività mutagena dell'-acridina e derivati. Caryologia 2, 229-297 (zitiert nach 37)
13. DEMEREC, M., 1953, Reaction of genes of E.coli to certain mutagens. Evolution, VII. Symp. Soc. Exp. Biol. (Cambridge), p. 43-54, University Press.

14. DEMEREC, M., 1955, What is a gene? Twenty years later. The Amer. Naturalist 89, 5-20.
15. DEMEREC, M., 1960, Frequency of deletions among spontaneous and induced mutations in Salmonella. PNAS 46, 1075-1078.
16. DEMEREC, M., BERTANI, G. und FLINT, J., 1951, A survey of chemicals for mutagenic action on E.coli. The Amer. Naturalist 85, 119-135.
17. DEMEREC, M. und HANSON, J., 1951, Mutagenic action of manganese chloride. Cold Spring Harbor Symp. Q.B. XVI, 215-228.
18. DEMEREC, M., LAHR, E.L., BALBINDER, E., MIYAKE, T., ISHIZU, J., MIZOGUCHI, K. und MAHLER, B., 1960, Bacterial genetics, Yearbook 59, 426-441 Carnegie Inst. Washington.
19. EHRENBERG, L., GUSTAFSSON, A. und LUNDQUIST, U., 1961, Viable mutants induced in barley by ionizing radiations and chemical mutagens. Hereditas 47, 243, 1961.
20. FREESE, E., 1959 a, On the molecular explanation of spontaneous and induced mutations. Brookhaven Symp. Biol. 12, 63-75.
21. FREESE, E., 1959 b, The difference between spontaneous and baseanalogue induced mutations of phage T₄. PNAS 45, 622-633.
22. FREESE, E., 1963, Molecular mechanism of mutations. Molecular genetics, Part I, p.207-269. Editor: Taylor, J.H., Academic Press New York, London.
23. FREESE, E., BAUTZ, E. und BAUTZ-FREESE, E., 1961, The chemical and mutagenic specificity of hydroxylamine. PNAS 47, 845.
24. GEISLER, E., 1962, Lysogenie und Cancerogenese, Neoplasma 9, 113-121.
25. GIERER, A. und SCHRAMM, G., 1956, Die Infektiosität der Nukleinsäure aus Tabakmosaikvirus. Zeitschr. für Naturforsch. 11 b, 138.
26. GLOVER, S.W., 1956, A comparative study of induced reversions in E.coli. Genetic studies with bacteria; Carnegie Inst. Wash. Publ. 612, 121-135.
27. GUSTAFSSON, A., 1960, Chemical mutagenesis in higher plants. Chemische Mutagenese, Abh. Dtsch. Akad. Wissensch., Klasse für Medizin, 14-29.
28. HINTERBERGER, K. und KRETZ, J., 1957, Über klinische Erfahrungen mit Bayer E₃₉. Der Krebsarzt 12, Heft 3.

29. JYER, V.N. und SZYBALSKI, W., 1958, Two simple methods for the detection of chemical mutagens. Appl. Microbiol. 6, 23-29.
30. KAPLAN, R.W., 1957, Mutation und Selektion als Ursache für die Anpassung der Mikroorganismen. Arzneimittelforsch. 7, 280-281.
31. KAPLAN, R.W., 1958, Genetik der Mikroorganismen. Fortschritte der Botanik, 20, 203.
32. KAPLAN, R.W., 1959, Studien über die UV-Mutabilität verschiedener Stämme von *Serratia* und über die Natur von Färbungsmutationen. Arch. Mikrobiol. 32, 138-160.
33. KAPLAN, R.W., 1961, Spontane Mutation von einer Monoauxotrophie zu einer anderen in einem Schritt (Auxotrophiesprungmutation) Zeitschr. Vererbungsl. 92, 21-27.
34. KAPLAN, R.W., 1962, Probleme der Prüfung von Pharmaka, Zusatzstoffen u.a. Chemikalien auf ihre mutationsauslösende Wirkung. Naturwissensch. 49, 457-462.
35. KAPLAN, R.W., BECKMANN, H. und RÜGER, W., 1963, Different "spectra" of mutant types by extracellular treatment of phage Kappa with differing mutagens, Nature 199, 932 - 933.
36. KAUDEWITZ, F., 1959, Inaktivierende und mutagene Wirkung salpetriger Säure auf Zellen von *Escherichia coli*. Zeitschr. Naturforsch. 14 b, 528-537.
37. LEVAN, A., 1951, Chemically induced chromosome reactions in *Allium cepa* and *Vicia faba*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 15, 233-244.
38. LEVAN, A. und TJIO, J.H., 1948, Induction of chromosome fragmentation by phenols. Hereditas 34, 453 (zitiert nach 37).
39. LINTON, A.H., 1958, Influence of inoculum size on antibiotic assays by the agar diffusion technique with *Klebsiella pneumoniae* and Streptomycin. J. Bact. 76, 94.
40. LITMAN, R.M. und PARDEE, A.B., 1960, The induction of mutants of bacteriophage T₂ by 5-bromouracil. Biochem. et Biophys. Acta 42, 131-140,
41. LORKIEWICZ, Z. und SZYBALSKI, W., 1961, Mechanism of chemical mutagenesis IV. Reaction between TEM and nucleic acid components. J. Bact. 82, 195-201.
42. LURIA, S.E. und DELBRÜCK, M., 1943, Mutation of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. Genetics 28, 491-511.

43. NETTER, H., 1959, Theoretische Biochemie, S.73, Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg
44. NOVICK, A., 1956, Mutagens and antimutagens. Brookhaven Symp. Biol.8, 201-215.
45. OEHLKERS, F., 1949, Mutationsauslösung durch Chemikalien. Sitzungsbericht Heidelberg. Akad.Wissensch., Math.-naturw.Klasse, 373-409.
46. RYAN, F.J., 1952, Adaptation to use lactose in E. coli. J. Gen. Microbiol. 7, 69-88.
47. RYAN, F.J., SCHWARTZ, M. und FRIED, P., 1955, The direct enumeration of spontaneous and induced mutations in bacteria. J. Bact. 69, 552 - 557.
48. RUDNER, R. und BALEINDER, E., 1960, Reversions induced by baseanalogues in Salmonella typhi-murium. Nature 186, 180.
49. SAGER, R. und RYAN, F.J., 1961, Cell Heredity, p.55, John Wiley & Sons, Inc., New York, London.
50. SCHUSTER, H., GIERER, A. und MUNDY, K.W., 1960, Inaktivierende und mutagene Wirkung der chemischen Veränderung von Nukleotiden in Virus-Nukleinsäuren. Chemische Mutagenese, Abh. Dtsch. Akad. Wissensch., Klasse Medizin, S.76-85.
51. STAHL, F.W., GRASEMANN, J.M., OKUN, L., FOX, E. und LAIRD, C., 1961, Radiation-sensitivity of bacteriophage containing 5-bromodeoxyuridine. Virology 13, 98
52. STRFLZOFF, E., 1961, Identification of base pairs involved in mutations induced by base analogues. Bioch. Biophys. Res. Com. 5, 384 - 388.
53. SZYBALSKI, W. und BRYSON, V., 1952, Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. J. Bact. 64, 489 - 499.
54. VOGT, M., 1948, Mutationsauslösung bei Drosophila durch Urethane. Experientia 4, 68,
55. WEBB, R.B. und KUBITSCHKE, H.E. 1963, Mutagenic and antimutagenic effects of Acridinorange in E.coli. Bioch. Biophys. Res. Com. 13, 90-94.
56. WEBER, E. 1961, Grundriss der Biologischen Statistik, S.397, VEB Fischer Verlag, Jena.
57. WESTERGAARD, M., 1957, Chemical mutagenesis in relation to the concept of the gene. Experientia 13, 224-234.
58. WITKIN, E., 1947, Mutations in E.coli induced by chemical agents. Neudruck in: Papers in Microbial Genetics, bacteria and bacterial viruses. Selected by Lederberg, Univ.Wisconsin Press 1952.
59. VIELMEYER, W., SCHUSTER, H. und WIEDER, C.M., 1960, Inaktivierende und mutagene Wirkung salpetriger Säure auf Phagen. Chemische Mutagenese, Abh. Dtsch.Akad.Wissensch., Klasse Mediz., S.92-97.

Lebenslauf

Am 22. Dezember 1928 wurde ich, Alois Tumulka, als Sohn des Landwirts Viktor Tumulka und seiner Ehefrau Agnes, geborene Mika in Herzoglich Ellguth, Kreis Ratibor, Oberschlesien, geboren. In den Jahren 1935 - 1939 besuchte ich die Volksschule und danach das Staatliche Dietrich-Eckardt-Gymnasium in Ratibor. Der Kriegseinsatz als Luftwaffenhelfer (1944-1945) unterbrach die weitere Schulausbildung an deutschen Schulen. Nach der Rückkehr aus sowjetischer Kriegsgefangenschaft wurde ich 1945 mit meinen Angehörigen im polnisch verwalteten Racibórz vorübergehend interniert. Von 1948 - 1951 besuchte ich das polnische Abendgymnasium für Berufstätige in Racibórz, wo ich auch die Reifeprüfung ablegte.

Mein Studium der Naturwissenschaften begann an der Universität Wroclaw (Breslau) (1952 - 1954) und wurde an der Universität Lodz (1954 - 1957) mit dem Diplom-Examen (Magister-Examen) in Biologie mit Spezialisierung in Mikrobiologie abgeschlossen. In den folgenden Jahren war ich als Bakteriologe zuerst am Bezirksuntersuchungsamt (Wojewodzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna) in Zielona Góra (Grünberg), später am Kinderkrankenhaus in Wroclaw tätig.

Im April 1959 siedelte ich in die Deutsche Bundesrepublik über. An den Universitäten in Köln (1959) und in Frankfurt/Main ergänzte und erweiterte ich mein Studium und konnte 1961 am Institut für Mikrobiologie in Frankfurt/Main mit dem experimentellen Teil der Doktorarbeit beginnen.

Das Promotionsexamen wird die Fächer Mikrobiologie, Organische Chemie und Pharmakologie umfassen.

Foto - Druck
Chemoprint^{OHG}
Gießen